

MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA

**ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DE CROMOSSOMOS ACROCÊNTRICOS HUMANOS EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE VARIANTES s^{+}**

Tese apresentada à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Genética Humana
da Universidade Federal do Paraná, para
obtenção do título de Mestre em Ciências
na área de Genética Humana.

CURITIBA
1980

Para meu pai,
meu mestre querido,
em tua homenagem.

Para minha mãe,
em tua memória,
dedico.

PROFESSOR ORIENTADOR

Iglenir João Cavalli

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Iglenir João Cavalli, pelos trabalhos de orientação que permitiram a realização deste projeto.

Ao Prof. Ives José Sbalqueiro, pela orientação técnica, principalmente no que se refere ao desenvolvimento dos métodos de bandeamento cromossômico.

Aos Profs. Natal Antonio Vello e Juarez Gabardo, pela elaboração da análise estatística dos dados, em especial a este último, que leu criticamente este trabalho, pelas tantas sugestões apresentadas.

À Dra. Margarete Suñé Mattevi e ao acadêmico Renato Flores, da U.F.R.G.S., que, respectivamente, nos permitiu e orientou o estágio feito no laboratório de Citogenética daquela Universidade.

Ao Prof. Henrique Elfes, pela correção gramatical do texto.

Às Prof^{as} Ligia Vieira Cesar e Maryse Manfredini Hapner, pela elaboração do *summary*.

À Ester Carneiro Giglio, pela correção do texto de Referências Bibliográficas.

À Vera Maria Santos Lima Rosa, pelos trabalhos de dâ-

tilografia e composição desta tese.

Às pessoas que colaboraram com a doação e coleta de material para esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela Bolsa concedida nos anos de 1976, 1977 e 1978.

À Universidade Federal do Paraná e à CAPES, pelo auxílio financeiro concedido para a confecção da tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa Integrado de Genética (PIG), que subvencionaram este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	x
Resumo	xii
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	4
2.1. Variante Cromossômica Ds+ e Gs+, e Efeito Fenotípico	4
2.2. A Fisiologia da Região dos Satélites e das Constrições Secundárias dos Acrocêntricos	13
2.3. Variante Cromossômica Ds+ e Gs+, e o Fenômeno da Associação	27
3. Material e Métodos	39
3.1. Caracterização da Amostra	39
3.2. Técnicas de Coleta, Cultura e Preparação das Células	46
3.3. Técnicas de Bandeamento Cromossômico ...	48
3.4. Técnica de Fotografia	50

	Página
3.5. Análise Citogenética	51
3.6. Tratamento Estatístico dos Dados	51
4. Resultados e Discussão	55
5. Conclusões	85
Summary	87
Referências Bibliográficas	89

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1.	Frequência dos diferentes tipos de associação simples de cada grupo nos dez indivíduos estudados	58
2.	Distribuição dos dados em função do intervalo de classe considerado com a respectiva frequência observada (F.O.) e a frequência esperada (F.E.), assim como o desvio (d) e o conseqüente valor de χ^2 .	59
3.	Frequência corrigida dos diferentes tipos de associação simples de cada grupo nos dez indivíduos estudados	60
4.	Distribuição dos dados corrigidos em função do intervalo de classe considerado com a respectiva frequência observada (F.O.) e a frequência esperada (F.E.), assim como o desvio (d) e o conseqüente valor do χ^2	61
5.	Análise de variância dos dados relativos à frequência de associações simples	62
6.	Frequência média de associação corrigida	

Tabela	Página
dos diversos tipos de associações de acrocêntricos dos grupos g_1 (D-D) e g_3 (G-G), assim como o valor de Δ a 10,5 e 1% de probabilidade do teste Tukey	69
7. Frequência de associação observada e corrigida de cada par cromossômico em cada um dos indivíduos da amostra	73
8. Análise de variância segundo o delineamento para blocos ao acaso, dos dados relativos à frequência de associação de cada par cromossômico	74
9. Frequência de associação observada e corrigida do cromossomo marcador e do respectivo homólogo em cada um dos indivíduos da amostra	77
10. Análise de variância segundo o delineamento para blocos ao acaso, dos dados relativos à frequência de associação do cromossomo marcador e do respectivo homólogo em cada um dos indivíduos da amostra	78

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
a	Cromossomos portadores de variantes s+ de cada uma das famílias estudadas, sem identificação (SIC); pares de cromossomos dos quais um dos homólogos é portador da variante s+, identificados pela técnica que revela as bandas G (CIC) ... 42
b	Cromossomos metafásicos de um dos indivíduos da amostra, submetidos à técnica que revela as bandas C 43
c	Cromossomos metafásicos de um dos indivíduos da amostra, submetidos à técnica que revela as bandas N 44
d	Curvas obtidas através da microfotodensitometria dos acrocêntricos autossômicos do grupo G de um dos indivíduos da amostra, portador de satélite gigante em um dos homólogos do par 22 45
1	Frequência (em %) de associações simples, segundo o grupo a que pertencem 64
2	Número médio de associações simples, se-

Figura		Página
	gundo o grupo a que pertencem	65
3	Frequência dos diferentes tipos de associação simples do grupo ₁ (D-D)	67
4	Frequência dos diferentes tipos de associação simples do grupo ₂ (D-G)	68
5	Frequência dos diferentes tipos de associação simples do grupo ₃ (G-G)	68
6	Frequência (em %) de associações simples e múltiplas em que participam os diferentes pares cromossômicos	75
7	Frequência (em %) de associações simples e múltiplas em que participam o cromossomo com a variante (marcador) e o seu homólogo	80

RESUMO

Um dos aspectos que tem sido explorado por ocasião do estudo das variantes cromossômicas menores diz respeito ao comportamento associativo de acrocêntricos portadores de variantes. Uma vez que a função de organizar o nucléolo é papel de certos cromossomos que se associam através da co-orientação de seus satélites, os estudos sobre os padrões de associação, classificados através da identificação do grupo cromossômico, do par cromossômico e até dos homólogos, revelam a participação destes cromossomos na formação do nucléolo. A presença de variantes morfológicas nos acrocêntricos permite a distinção dos homólogos e, consequentemente, a análise comparativa entre eles.

O nosso trabalho teve por objetivo elaborar uma análise semelhante à comentada acima em uma amostra de dez indivíduos portadores de satélites gigantes. A identificação cromossômica, feita através da técnica de G-bandeamento, permitiu que as associações simples (que perfaziam cerca de 70% da amostra), classificadas

em grupos (D-D,1; D-G,2; G-G,3), fossem subdivididas em vários tipos, conforme os cromossomos envolvidos (13-13, 13-14, etc.). Os resultados da análise estatística indicaram que as frequências dos três grupos de associação não se mostraram diferentes e que, por outro lado, os tipos de associação dos grupos 1 e 3 não participaram deles com igual frequência, sendo as associações entre cromossomos homólogos mais raras que as entre heterólogos.

A participação dos diversos pares de acrocêntricos, quando consideradas as associações simples e múltiplas, foi casual nos vários indivíduos da amostra, sendo a frequência do par 21 ligeiramente maior.

O comportamento associativo dos cromossomos marcadores, quando comparado ao de seus homólogos, não se mostrou diferente nos vários indivíduos da amostra. Os cromossomos D e Gs+ associaram-se preferencialmente ($0,05 < P < 0,1$), o que sugere a existência de cis-trons para ARN ribossômico na região dos satélites dos acrocêntricos.

1. INTRODUÇÃO

O reconhecimento da considerável variação cromossômica existente nas populações humanas tem delineado novos rumos para a Citogenética Humana. A descoberta e o aprimoramento das técnicas de bandeamento cromossômico (CASPERSSON et al., 1970; ARRIGHI & HSU, 1971; DRETS & SHAW, 1971; DUTRILLAUX & LEJEUNE, 1971; PATIL et al., 1971; SEABRIGHT, 1971; SUMNER et al., 1971, etc.) permitiram não somente a identificação precisa dos pares cromossômicos (aplicada em seguida para diagnóstico de uma série de cromossomopatias) como também da enorme variação cariotípica humana, compatível com o desenvolvimento fenotípico normal.

Variantes sem significado clínico aparente são denominadas *menores*, em oposição às *maiores*, que conduzem a fenótipos anormais ou, quando presentes em estado balanceado, levam a um aumento no risco de produção de proles anômalas (LUBS & RUDDLE, 1970 e FERGUSON-SMITH, 1974). Com o objetivo de entender-se as implicações biológicas destas variantes menores, dife-

rentes estudos têm sido elaborados. Assim, o trabalho de COURT BROWN, JACOBS e BRUNTON (1965) foi pioneiro quando verificou, em uma amostra de 438 pessoas, a frequência de variantes menores e sugeriu que estas seriam herdadas e que, embora sem efeito fenotípico para seus portadores, poderiam aumentar o risco de produção de proles anormais.

Em seguida, utilizando-se das técnicas de identificação cromossômica, os trabalhos de ZANKL & ZANG (1971); FRIEDRICH & NIELSEN (1973); CHRISTENSEN & NIELSEN (1974); HAMERTON et al. (1975); MÜLLER et al., 1975; FUNDERBURK et al. (1978); THARAPEL & SUMMITT (1978), entre outras publicações, forneceram uma série de informações sobre variantes cromossômicas menores. Estes estudos incluem dados de distribuição e de frequência das variantes menores em várias populações de indivíduos anômalos e normais e, até, de raças diferentes, o que têm contribuído para uma real avaliação de seu significado.

Entretanto, a discussão em torno do efeito destas variantes, não somente em termos de manifestação clínica, permanece. ZANKL & ZANG (1974) afirmaram que os polimorfismos de cromossomos acrocêntricos - variações no tamanho do braço curto, da constrição secundária e dos satélites - poderiam apresentar algum efeito funcional, não revelado clinicamente. A relação entre

estas pequenas variações e a frequência de associação destes cromossomos foi verificada: cada acrocêntrico apresentaria uma frequência de associação característica e constante, e as diferenças entre as frequências de associação dos pares de acrocêntricos resultariam de diferentes participações de cada homólogo (CAPOA et al., 1973; SCHMID & KRONE, 1974 e ZANKL & ZANG, 1974). Estas informações surgiram à medida que os métodos de bandeamento cromossômico permitiram que se detectassem características morfológicas constantes, que funcionam como marcadores cromossômicos, e a consequente distinção dos homólogos de cada par.

O presente trabalho possui um caráter particular, pois pretende informar a respeito de um possível efeito fisiológico de uma variante menor, os satélites gigantes. O acréscimo de material heterocromático na região dos satélites poderia alterar as frequências de associação dos acrocêntricos, especificamente de cada homólogo do par onde um deles possui o marcador. A análise comparativa entre os homólogos deve revelar a participação de cada um deles na formação do nucléolo, participação esta que é *visualizada* na célula quando há associação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. VARIANTE CROMOSSÔMICA Ds+ E Gs+, E EFEITO FENOTÍPICO

A existência de pequenas variações no cariótipo humano, tal como o tamanho aumentado dos satélites, foi a princípio relacionada com as anormalidades fenotípicas presentes em pacientes que as apresentavam.

Assim, TJIO et al. (1960) descreveram a presença de satélites aumentados em dois pacientes com síndrome de Marfan. Em um deles, a variante se apresentava em um dos cromossomos do grupo D, ao passo que, no outro, em um dos cromossomos do grupo G. Baseados nestas informações, estes autores sugeriram uma relação de *causa-efeito* entre o tamanho aumentado dos satélites e a síndrome de Marfan. Entretanto, outros estudos que datam da mesma época indicaram ausência desta relação, em razão de seus autores terem observado vários casos da referida síndrome relacionados com cariótipos

com ausência da variante (McKUSICK, 1960), ou ainda a presença de satélites proeminentes em indivíduos normais, membros da família de pacientes que apresentavam a síndrome e a variante (KÄLLEN & LEVAN, 1962 e HANDMAKER, 1963).

Um dado interessante da literatura é que as publicações não se limitam a descrever a presença de variantes menores em indivíduos anômalos, mas procuram demonstrar a ocorrência familiar destas variantes que, em geral, afetam indivíduos aparentados normais. Nesse sentido, o exame de cariótipo de duas crianças anômalas feito por COOPER & HIRSCHHORN (1961 e 1962), revelou a presença de satélites aumentados nos pacientes e em vários outros membros normais de suas famílias. Um destes dois casos, descrito mais detalhadamente em outro trabalho (HIRSCHHORN et al., 1961), diz respeito a um paciente com síndrome de Down que desenvolveu leucemia aguda e que apresentava cariótipo com uma translocação interpretada como sendo 21/22, além de satélites aumentados em um dos acrocêntricos maiores.

PENROSE & DELHANTY (1961) analisaram cariotipicamente dois irmãos com síndrome de Down que mostravam uma fusão do tipo D/G, também presente em uma irmã, na mãe e na avó dos pacientes, todas normais. A avó apresentava ainda satélites aumentados em um dos cromossomos do grupo D, provavelmente homólogo daquele

envolvido na fusão. Esta variante aparecia também em seu filho, tio materno dos afetados. Dois estudos semelhantes (CHAPELLE et al., 1963 e CAVALLI et al., 1971) descreveram, em um mesmo indivíduo, satélites gigantes e anormalidades do sistema nervoso central. Da mesma forma que ELLIS & PENROSE (1961), que estudaram citogeneticamente cinco indivíduos normais, dos quais três apresentavam satélites gigantes, membros de uma família onde outros indivíduos eram portadores de malformações severas do sistema nervoso central, estes dois estudos demonstraram ocorrência familiar da variante estudada.

Esta série de estudos sugere uma conclusão importante: estas pequenas variações estruturais seriam compatíveis com o desenvolvimento normal. Além disso, há outros trabalhos que se propõem discutir uma causa para o aparecimento dos satélites aumentados e um efeito não diretamente relacionado com a anormalidade fenotípica em questão. Deste modo, a investigação de uma entidade clínica associada, em um mesmo indivíduo, à presença de satélites aumentados, serve como exemplo.

A respeito de retardamento mental associado à presença de satélites gigantes há várias contribuições diferentes. A ocorrência de um cromossomo extra com satélites em ambos os braços, em uma criança com retardamento mental, foi observada por ELLIS et al. (1962),

que verificaram satélites aumentados em um dos acrocêntricos do grupo G no pai e no irmão do paciente. Por outro lado, JACOBSON et al. (1964) observaram satélites gigantes em um dos cromossomos do grupo D, em quatro de cinco indivíduos retardados mentais de uma família. Estes autores sugeriram que a relação entre estas duas entidades poderia ser explicada (a) pelo acaso, (b) por ligação ou (c) por duplicação, translocação ou outra aberração estrutural que resultaria em retardo mental.

A exemplo do trabalho anteriormente comentado, alguns estudos sugeriram explicações citológicas (excluindo o aspecto casual), para estas associações. Duas observações (um caso de fragmento dicêntrico com satélites e ausência de um cromossomo do grupo G em um paciente com síndrome de Turner, e um cromossomo anormal com satélites duplos e fragmento cêntrico supranumerário em um paciente com malformações variadas) poderiam explicar, pelo menos em parte, segundo GROUCHY et al. (1964), o fenômeno das *associações cromossômicas*. É possível, de acordo com estes autores, que pequenas variações no cariótipo não sejam prejudiciais por elas mesmas, podendo ser transmitidas de geração a geração de modo silencioso até provocar bruscamente, uma outra alteração em um cromossomo diferente, que seria então desvantajosa.

Da mesma forma, LUCIANI et al. (1968), por ocasião do estudo de quatro famílias, observaram oito casos de satélites duplos (ocasionalmente triplos) em um dos acrocêntricos maiores, e propuseram o fenômeno da duplicação como possível explicação da variação observada na morfologia dos satélites. Estes autores, embora admitindo que o material genético da região dos satélites tem pouca atividade, concluíram que estas variantes poderiam contribuir para aumentar o risco de não-disjunção. DEKABAN et al. (1963) fazem referência a um possível aumento de produção de proles anômalas provocado pela presença de variantes menores em seus portadores.

As afirmativas mencionadas acima contrariam as de HAMERTON et al. (1965), SANDS (1969) e de TUNCBILEK (1976). SANDS (1969), por exemplo, estudou 232 pacientes com síndrome de Down e encontrou oito deles com pequenas variações nos braços curtos dos acrocêntricos (3,8%). Esta proporção concorda com o observado por HAMERTON et al. (1965) que, analisando citogeneticamente 208 famílias com ocorrência de síndrome de Down, encontraram em 7 delas (3,3%) anomalias cromossômicas menores. Entre as outras 142 famílias, incluídas no trabalho de SANDS (1969) por apresentarem ocorrência de anomalias físicas e mentais ou consanguinidade com os pacientes mongolóides, quatro indivíduos possuíam

variantes (2,8%). Nas duas populações analisadas, as frequências não diferem de modo significativo, o que indica, segundo a autora, não haver qualquer efeito das variantes no sentido de aumentar o risco de não-disjunção.

De acordo com COOPER & HIRSCHHORN (1962) e HOSSFELD et al. (1970), o aumento no tamanho dos satélites e nas constrições secundárias representaria alterações na espiralização e condensação do material genético, resultando na heterocromatização destas regiões. Sob estas circunstâncias, não haveria mudança quantitativa substancial no material genético, o que poderia explicar a ausência de efeito fenotípico destas variantes, inclusive em relação ao risco de não-disjunção, que não seria maior em seus portadores.

Com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico, as averiguações feitas em indivíduos com distúrbios fenotípicos têm contribuído de forma particular quando da apresentação de hipóteses e sugestões.

WILSON et al. (1973) descreveram um caso de craniostenosis e retardamento mental em uma criança com satélites gigantes no cromossomo 13 e uma deleção parcial no cromossomo 7, identificados por G-bandeamento. A porção fortemente corada do satélite se parecia com a banda ausente na porção distal do cromossomo 7, indicando a existência de uma translocação. Esta

hipótese concorda, segundo os autores do trabalho, com o fato dos pais da criança não apresentarem satélites gigantes, que seriam, portanto, uma translocação de material cromossômico. Os distúrbios fenotípicos apresentados pelo paciente poderiam ser explicados admitindo-se que o excesso ou deficiência de certas quantidades de material genético *carregadas* pelos satélites poderiam conduzir a anormalidades (MILLER et al., 1961). Entretanto, uma outra alternativa é apresentada: a anomalia seria consequência da deleção propriamente dita, e o satélite gigante surge nesta família como uma nova variante, compatível com a normalidade.

MOREIRA (1976) elaborou um estudo familiar das alterações 21ps+, 22ps+ e 15ps+ sendo que os probandos com síndrome de Down apresentavam a variante nos cromossomos 22 e 15. Um interessante dado observado é que ocorreu segregação diferencial em duas destas alterações: 21ps+ e 22ps+. Baseando-se em FITZGERALD (1973), a autora sugeriu que o aumento no grau de heterocromatina interfere na segregação, levando à formação de gametas anormais. Além disso, salientando o fato de que os indivíduos estudados possuíam fenótipos heterogêneos, concluiu não haver relação entre esta variante e os fenótipos apresentados.

Os trabalhos até aqui citados estão principalmente relacionados com a investigação citogenética de

casos particulares de indivíduos com anormalidades fenotípicas. A ocorrência familiar das variantes menores além de sugerir uma relação casual entre a sua presença e o quadro clínico em estudo, indica a necessidade de investigações a nível populacional, o que é justamente salientado em vários destes estudos.

Um aspecto que caracteriza um certo grupo de publicações - entre elas a de HAMERTON et al. (1965) e de SANDS (1969), já comentadas - é a preocupação em averiguar as frequências das variantes menores em diferentes populações. A análise cariotípica feita por STARKMAN & SHAW (1967), em 40 indivíduos com síndrome de Down e em 40 controles das raças negra e branca, revelou que, no primeiro grupo, havia oito indivíduos com satélites e/ou braços curtos aumentados (20%), enquanto, no grupo controle somente três apresentavam estas variantes (7,5%). Se compararmos os dados de FRIEDRICH & NIELSEN (1973) com os de CHRISTENSEN & NIELSEN (1974), que foram obtidos em populações distintas, podemos verificar que a variante Gs+ ocorre com frequências diferentes. No primeiro trabalho, foi investigada uma população de 5049 recém nascidos, 20 dos quais eram portadores de variantes Gs+ (0,4%). Já os resultados de CHRISTENSEN & NIELSEN (1974), revelaram uma incidência muito maior da mesma variante (6,8%), o que pode ser explicado pelo pequeno número de indivíduos

analisados (igual a 77). Em razão de estes dados terem sido obtidos em uma população de doentes mentais, segundo os autores do trabalho, esta alta frequência observada seria uma indicação de que os indivíduos com variantes Gs+ teriam um risco maior de apresentar perturbações mentais.

Entretanto, as especulações sobre a existência de uma relação causal entre variantes menores e anormalidades fenotípicas deixam de ser mostradas na literatura quando são iniciadas as pesquisas em populações normais. Já em 1964, Jacobs, Brunton e Court Brown afirmavam que os polimorfismos cromossômicos não estariam associados com quaisquer perturbações e que seriam mais frequentes que o suposto, na época. Em seguida, entre os trabalhos que são publicados a respeito da citogenética de populações normais, o amplo estudo feito por LUBS & RUDDLE (1970) merece destaque. Em uma população de 2444 recém-nascidos, foram definidas 27 variantes menores com informações de frequência e critérios a serem adotados para o seu reconhecimento. Em relação à variante *satélites gigantes*, foi observado que a frequência de indivíduos Ds+ foi de 3%, enquanto a de indivíduos Gs+ foi de 2,5%. O critério estabelecido por estes autores, adotado inclusive por este trabalho, considera gigante o satélite quando ele é maior do que o braço curto do acrocêntrico que o

apresenta.

A partir de então, surge uma série de publicações, algumas delas já mencionadas neste trabalho, que têm por objetivo o estudo populacional dos polimorfismos cromossômicos. Além disso, as variantes polimórficas que envolvem alterações da constrição nucleolar e dos satélites dos cromossomos acrocêntricos passaram a ser preferencialmente analisadas sob o aspecto fisiológico. As técnicas de bandeamento (G, C, N e NOR), associadas aos métodos de hibridação celular e, ainda, à análise do comportamento associativo dos cromossomos portadores de variantes, têm fornecido importantes informações sobre a síntese de ADNr e conseqüente transcrição de ARNr. Em função disso, o presente relato pretende em seguida explorar este polimorfismo cromossômico específico a nível de sua fisiologia.

2.2. A FISILOGIA DA REGIÃO DOS SATÉLITES E DAS CONSTRIÇÕES SECUNDÁRIAS DOS ACROCÊNTRICOS

O nucléolo pode ser considerado como um locus diferenciado de um cromossomo particular. Esta afirmativa, feita por Sirlin em 1961 (segundo MUTCHINICK, 1976), traduz o comprometimento de certas regiões cro-

mossômicas com a organização nucleolar. O primeiro trabalho que atribuiu esta função a determinadas áreas cromossômicas, as constrições secundárias, foi o de Heitz em 1933 (segundo OHNO et al., 1961) que denominou estas constrições de zona S.A.T. (*sine acido thimonucleico*) em razão de se apresentarem pouco coradas com Feulgen na metáfase. Os estudos feitos por OHNO et al. (1961) e por FERGUSON-SMITH & HANDMAKER (1961) não só confirmaram a hipótese de Heitz como indicaram que o nucléolo é organizado por certos cromossomos que se associam. FERGUSON-SMITH & HANDMAKER (1961) admitiram ainda que *a associação de satélites e fusão nucleolar seriam, provavelmente, manifestações de um mesmo fenômeno.*

O processo de organização do nucléolo e o fenômeno da associação de cromossomos acrocêntricos têm sido, nesta última década, objeto de investigação por muitos citogeneticistas. Com o advento das técnicas de hibridação *in situ* e de bandeamento cromossômico, alguns aspectos, particularmente relacionados com estes fenômenos, tais como localização, número e extensão das regiões organizadoras do nucléolo (RON) têm merecido especial atenção.

Assim, vários autores demonstraram que as RON localizam-se, no homem, nas constrições secundárias dos cromossomos acrocêntricos. Esta informação, entretan-

to, não corresponde aos achados de outros estudos, que encontraram RON na região dos satélites dos acrocêntricos. No entanto, é comum a opinião de que os cistrons responsáveis pela formação do nucléolo estão nos braços curtos dos acrocêntricos, tal como foi demonstrado por HENDERSON et al. (1972). Neste particular, foram importantes os resultados obtidos por EVANS et al. (1974) que, utilizando o método de hibridação *in situ*, concluíram que os sítios de transcrição de ARN ribossomal (ARNr) estariam, de fato, nas constrições secundárias dos cromossomos acrocêntricos.

A confirmação dos resultados obtidos por EVANS et al. (1974) tornou-se evidente quando foram descobertas técnicas especiais que se caracterizam pelo emprego da prata amoniacal. GOODPASTURE et al. (1976), utilizando esta metodologia, concluíram que as áreas dos cromossomos mitóticos impregnadas pela prata representariam os cistrons de ADNr e, conseqüentemente, as RON. No cariótipo humano, o método da prata permitiu também que se reconhecesse, nas áreas acromáticas dos acrocêntricos ou constrições nucleolares (*stalks*), o controle da organização nucleolar. Este termo *constrição nucleolar* se refere, segundo GOODPASTURE et al. (1976), às áreas ou constrições secundárias dos cromossomos que têm RON. As regiões heterocromáticas dos cromossomos 1, 9 e 16 seriam um exemplo de constrição

secundária que não têm RON.

Estas informações permitiram a GOODPASTURE et al. (1976) criticarem os estudos de MATSUI & SASAKI, 1973, que utilizaram a técnica de N-bandeamento, os de HOWELL et al., 1975, e os de DENTON et al., 1976, que empregaram o método Ag-SAT, em razão de estes trabalhos terem indicado que as RON estariam nos satélites dos acrocêntricos. Esta hipótese foi refutada por GOODPASTURE et al. (1976), porque implica admitir que a espécie humana seria a única a apresentar as RON nos satélites.

Uma outra contribuição que, de certa forma, contraria as conclusões de GOODPASTURE et al. (1976) foi dada por STAHL et al. (1976). Estes autores demonstraram que a cromatina associada à formação do nucléolo estaria contida em diferentes segmentos cromossômicos, isto é, (a) nos braços curtos dos acrocêntricos do grupo D e G e (b) nas regiões heterocromáticas dos cromossomos 1, 9 e Y.

Recentemente, a análise feita por MARTIN et al. (1979) revelou que o material impregnado pela prata corresponderia à região das constrições nucleolares e à parte distal dos satélites que, em conjunto, representariam as RON. Entretanto, de acordo com estes autores, seria mais provável que a parte distal dos satélites estivesse apenas encoberta por material de-

rivado das constrições nucleolares, particularmente quando a contração fosse maior. Estes resultados suportam, mais uma vez, a hipótese de que as RON estariam localizadas nas constrições nucleolares dos cromossomos acrocêntricos.

Outro aspecto interessante a ser comentado diz respeito à atividade das RON dos acrocêntricos, relacionada ao número e extensão das mesmas, e que pode ser *visualizada*, na metáfase, através do fenômeno da associação. OHNO et al. (1961), com o objetivo de investigar o número de cromossomos que se associam para formar o nucléolo, encontraram que, em nenhum momento, havia mais de seis cromossomos associados, ou seja, mais de seis RON ativas. OHNO et al. (1961) concluíram que todas as RON seriam potencialmente ativas, mas não simultaneamente.

Um trabalho semelhante feito por FERGUSON-SMITH & HANDMAKER (1963) revelou que as diferenças na atividade entre os organizadores nucleolares poderiam estar relacionadas com a expressão variável das constrições secundárias. JACOBS et al. (1964) concordaram com esta suposição quando admitiram que as constrições secundárias representariam variações das regiões heterocromáticas. Elas apareceriam subterminais nos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22, e estariam mais proximalmente situadas nos cromossomos 1, 9 e 16. GOODPASTURE et al.

(1976) observaram que o número de constrições nucleolares varia entre duas metáfases de um mesmo indivíduo e entre dois indivíduos. Além disso, em uma determinada população de células, estes autores encontraram que as constrições nucleolares variam em extensão. EVANS et al. (1974) salientaram que o comprimento da constrição nucleolar seria um dos fatores capazes de influenciar no número de genes por organizador nucleolar. Na realidade, o fato de as RON se apresentarem como sistemas polimórficos implica existir variação na quantidade de genes que codificam ARNr por genoma.

Este aspecto, a quantidade de genes que codificam ARNr, tem merecido muita atenção. SPADARI et al. (1973) concluíram haver correlação positiva entre esta quantidade e o número de cromossomos acrocêntricos. Bross & Krone, em 1972 (segundo STEFFENSEN, 1977), encontraram 416 cistrons de ADNr por célula diplóide em metáfase ou, em média, 82 por par de acrocêntrico ou RON. SCHMICKEL (1973) determinou o número de genes para ARNr utilizando discos de nitrocelulose para hibridação de ADN por ARN. O ARN hibridou, em média, 14×10^{-5} daltons do total do ADN humano. Uma célula diplóide contém cerca de $5,5 \times 10^{12}$ daltons de ADN e, segundo SCHMICKEL (1973), o ARN hibridou com $7,7 \times 10^8$ daltons do ADNr, o que é aproximadamente igual a 320 genes. Este autor observou ainda uma variação na quan-

tidade de hibridação do ADN pelo ARN quando comparou células diplóides de diferentes tecidos. Por outro lado, comparações entre células trissômicas e normais não mostraram diferenças.

Particularmente importantes foram os dados obtidos por WARBURTON et al. (1976), que estabeleceram, por hibridação *in situ*, a variação no número de genes para ARNr por RON. As diferenças observadas entre os cromossomos, nas suas quantidades de ARNr hibridadas, refletiam diferenças no número de cópias de genes por RON. Estes autores admitiram que as frequências de associação de cada acrocêntrico estariam positivamente correlacionadas com o grau de hibridação, embora haja exceção para esta regra. A principal conclusão exposta neste trabalho refere-se ao fato de que o conteúdo de ADNr deve ser um dos fatores que influenciam nas associações. Esta afirmativa está de acordo com o encontrado por SCHWARZACHER et al. (1978).

De modo semelhante à determinação da localização das RON, o emprego da prata permitiu que se demonstrasse a existência de correlação positiva entre a impregnação pela prata nas RON e a atividade dos genes para ADNr (ARCHIDIACONO et al., 1977). Resultados iguais foram obtidos por HUBBELL & HSU (1977), que encontraram diferença entre o número de acrocêntricos corados pela prata em células tumorais e controles. As células

tumorais apresentaram maior síntese de ARNr, o que se deve à maior transcrição de genes ativos. O nível de coloração e a atividade devem estar relacionados ao número de genes. Em uma linhagem de hepatoma de rato, MILLER (1978) observou um aumento similar no número de genes para ARNr.

O polimorfismo de bandas impregnadas pela prata parece, realmente, ser uma característica do cromossomo e do indivíduo, ainda que um mesmo indivíduo possa apresentar variações. Isto se deve à funcionalidade ou à quantidade de ADNr (MIKELSAAR et al., 1977a e SCHWARZACHER et al., 1978). De fato, os padrões de banda de crianças com trissomia do 21 são, geralmente, herdadas de seus pais e refletem diferenças individuais na quantidade de ADNr e na capacidade de ativação das RON (MIKELSAAR et al., 1977b e MARCOVIC et al., 1978). Esta capacidade de ativação foi demonstrada por GOSDEN et al. (1979) em um caso de translocação dicêntrica, originada por fusão de dois cromossomos maternos, 13 e 14. O probando, que não apresentava RON na translocação, tinha todos os G ativos. É interessante o fato de a mãe somente apresentar o par 22 ativo, sugerindo, por isso, a existência de um mecanismo de compensação, por ativação, no probando, que perdeu cerca de 60% de seu ADN (satélite III) por ocasião da fusão.

Vários aspectos do metabolismo celular foram

analizados por GUANTI & MARITATO (1978), que concluíram ser constante o conteúdo de ARNr de linfócitos com diferentes quantidades de ADNr; que a síntese de ADNr não varia entre os indivíduos, e que há variação na síntese protéica destas células em função das diferentes quantidades de ADNr. Comparações feitas em tecido linfocitário e fibroblástico de três indivíduos mostraram que havia um padrão similar de coloração das RON pela prata, nos dois tecidos, em cada indivíduo (MIKELSAAR & SCHWARZACHER, 1978).

Recentemente, MILLER et al. (1978) evidenciaram que nem todos os agregados de ADNr participariam da atividade de organização nucleolar e, conseqüentemente, da transcrição, e que somente as RON ativas seriam coradas pela prata. Esta coloração seria positiva em RON de células mitóticas que estavam funcionalmente ativas durante a metáfase precedente (Miller et al., 1976 a e b segundo SCHWARZACHER et al., 1978). Observações feitas em mitoses e meioses e em núcleos interfásicos indicaram que a impregnação pela prata se daria em componentes da proteína ribonucleica que envolve as RON. Esta afinidade mostra que a proteína ribonucleica forma o componente fibrilar do nucléolo (SCHWARZACHER et al., 1978). A natureza do material corado pela prata é incerta. Como foi mencionado, parece haver maior quantidade de proteína do que ADN ou

ARN. Entretanto, é desconhecido se há ou não participação de outros componentes além desta proteína ribonucleica (MILLER et al., 1977).

A partir desta série de estudos que visam esclarecer o processo da organização nucleolar, foi-nos possível abordar vários aspectos: a localização e a atividade das RON (relacionada ao seu número e extensão), a quantidade de genes que codificam ADNr e, ainda, a natureza molecular do componente responsável pelo aparecimento de bandas provocadas pela ação da prata nestas regiões. No entanto, dois outros aspectos devem ser ainda explorados nesta Revisão: a caracterização do ADN que constitui estes sítios e os tipos de ARN transcritos.

O ADN humano, quando submetido à centrifugação em gradientes de cloreto de cézio, forma um pico principal de densidade e outros pequenos picos de densidades variáveis. Estes picos diferem do principal por apresentarem seqüências de bases idênticas repetidas e são denominadas ADN satélites (SCHWARZACHER, 1976).

Nem todos os ADN satélites foram isolados através do mesmo procedimento técnico e a partir da mesma amostra. Basicamente, o ADN satélite é caracterizado de acordo com sua densidade em cloreto de cézio neutro, em cloreto de cézio alcalino, onde a separação das fitas pode ser analisada, e em cloreto de cézio

neutro após desnaturação e renaturação sob condições definidas. Oito tipos de ADN satélites aparecem descritos na literatura. Quatro denominados ADN satélites I, II, III e IV, os dois primeiros ricos em adenina e timina e os últimos ricos em guanina e citosina, e quatro denominados A, B, C e D (Corneo et al., 1967, 1970, 1971 e 1972; Chuang & Saunders, 1974 e Saunders et al., 1972 e 1975, segundo MACAYA et al., 1977).

Cerca de 30 a 35% do genoma humano seria composto, de acordo com Arrighi & Saunders, 1973 (segundo SCHWARZACHER, 1976), por ADN repetitivo localizado praticamente em todas as regiões que apresentam heterocromatina constitutiva. Entre estas regiões que contêm ADN repetitivo estão os cistrons responsáveis pela organização do nucléolo, localizados nas constrições secundárias dos acrocêntricos (Birnstiel et al., 1968 e Lima de Faria et al., 1969, segundo SCHWARZACHER, 1976). Embora não se tenha observado maior acúmulo de ADN satélite nestas regiões, Jones et al., 1973 (segundo SCHWARZACHER, 1976), observaram uma certa tendência do ADN satélite III, rico em guanina e citosina, a localizar-se nos cistrons para ARNr. STEFFENSEN (1977), baseando-se em JONES et al., 1975, distribuiu da seguinte forma os ADN satélites: ADN satélite I, no cromossomo 3 e nos braços curtos dos acrocêntricos; ADN satélite II, nos cromossomos 1, 9, 16 e Y; ADN satélite

III, nos cromossomos 9 e acrocêntricos, e ADN satélite IV, nos cromossomos Y, 13, 14, 15, 21, 22 e 20. Estes resultados contrariam, em parte, os achados de GOSDEN et al. (1975), que mostraram os ADN satélites assim distribuídos: ADN satélite I, principalmente nos cromossomos 9 e Y e nos pares 14, 15, 21 e 22; ADN satélite II, mais freqüentemente nos cromossomos 9 e Y além de nos pares 1, 15, 16, 17, 21 e 22, e ADN satélites III e IV, nos cromossomos 9, 15 e Y e nos pares 13, 14, 20, 21 e 22, sendo que no cromossomo 17 aparece ainda o ADN satélite III. De acordo com MACAYA et al. (1977), dos ADN satélites A, B, C e D, somente o C e o D localizam-se preferencialmente na banda C do par 9. O ADN satélite A apresenta-se distribuído homogeneamente por todos os cromossomos e o B é encontrado ligado ao nucléolo.

É comum a opinião dos estudiosos quanto ao fato de as regiões evidenciadas por C-bandeamento serem compostas de ADN altamente repetitivo e, corresponderem, algumas delas, às constrições secundárias de certos cromossomos (1, 9, 16 e acrocêntricos). GOSDEN et al., (1978) sugeriram que a função deste ADN altamente repetitivo deveria estar associada à formação do nucléolo. A relação entre freqüência de associação e concentração de ADN satélite é um suporte para comprovação desta hipótese. A perda de 60,5% de ADN satélite III, ob-

servada por GOSDEN et al. (1979) em uma translocação 13/14, confirmou a presença de ADN satélite nas RON, ausentes nesta aberração, que não se corava pela prata. Esta associação, *heterocromatina e nucléolo*, foi anteriormente salientada por STAHL et al. (1976).

Está estabelecido, há algum tempo já, que o nucléolo é a sede da síntese de ARNr enquanto os ribossomos se constituem na sede da síntese protéica. Segundo HERSKOWITZ (1977), os ribossomos dos eucariontes podem ser de três diferentes tamanhos: 70S (S = coeficiente de sedimentação), encontrado nos cloroplastos; 60S, encontrado nas mitocôndrias; e 80S, encontrado no citoplasma destes organismos. Todos estes tipos são compostos de duas subunidades, ambas ribonucleoproteínas, nas quais o ARNr contribui com cerca de 2/3 do peso, enquanto a proteína, o faz com 1/3. A partícula 80S (citoplasmática) é constituída de uma subunidade 40S ligada a outra, 60S. Neste ribossomo, o ARNr 18S está na subunidade 40S e os ARNr 5S, 7S e 28S estão na subunidade 60S. Esta, por sua vez, contém 39 diferentes proteínas, enquanto a subunidade menor contém 32.

Através do uso das técnicas de hibridação *in situ*, STEFFENSEN (1977) indicou a localização dos tipos de ARNr humano. Neste artigo, o autor faz referência a vários trabalhos que, em síntese, nos permitem concluir o seguinte: os genes para ARNr 5S aparecem

associados ao nucléolo e tendem a estar próximos aos finais dos cromossomos maiores. Embora sua localização não esteja definida, há indicação de que eles estariam, em grande parte, no cromossomo 1, e os loci remanescentes nos cromossomos 3, 9, 16 e 22. Assim, a análise de três diferentes translocações, todas envolvendo o cromossomo 1, mostrou que há relação entre este e o nucléolo (STEFFENSEN et al., 1975). Aproximadamente 8000 cistrons codificariam ARNr 5S por célula em metáfase. No entanto, segundo HATLEN & ATTARDI (1971), a maioria dos sítios de ARNr 5S não seriam transcritos. Em relação à localização dos genes 18S e 28S, os achados de HENDERSON et al. (1972) e de EVANS et al. (1974) indicaram que eles estariam nas constrições nucleolares dos cromossomos acrocêntricos.

À medida que se estabelecer, destes dez possíveis blocos de genes para ADNr, quantos são realmente ativos e, por isso, transcrevem ARNr 18S e 28S, assim como qual o papel dos segmentos cromossômicos que contêm ADN altamente repetitivo e que funcionam como sítios de reconhecimento, o fenômeno da associação - que reflete a participação dos cromossomos D e G na formação do nucléolo - poderá ser amplamente entendido. Por isso, os aspectos conhecidos e os resultados até agora encontrados a respeito deste fenômeno serão abordados na parte seguinte desta Revisão com o intuito de si-

tuar este trabalho naquilo que ele se propõe em síntese: um estudo específico de associação de cromossomos acrocêntricos.

2.3. VARIANTE CROMOSSÔMICA Ds+ E Gs+, E O FENÔMENO DA ASSOCIAÇÃO

O fenômeno da associação de cromossomos acrocêntricos é reconhecido, em células metafásicas, como o resultado da atividade de um certo número de genes capazes de controlar a organização nucleolar. Através do estudo da fisiologia das regiões responsáveis pela formação do nucléolo (RON), abordado sob diferentes aspectos anteriormente neste trabalho, pode-se explicar a origem deste processo. A análise das associações é importante, não somente devido ao fato de elas estarem relacionadas à fusão nucleolar, mas também pelas suas possíveis implicações no aparecimento de certas anormalidades cromossômicas estruturais, como sejam translocações do tipo fusão cêntrica, e numéricas, como aneuploidias por não-disjunção.

O processo que conduz os cromossomos a se associarem está sujeito à ação de uma série de variáveis.

Algumas delas são conhecidas, tais como tipos de células, técnicas de cultura, idade, sexo e raça. A existência de fatores que interferem neste processo, seja na sua frequência total, seja na frequência com que cada cromossomo individualmente participa, faz com que os padrões de associação variem entre indivíduos, entre diferentes pares de cromossomos e até entre homólogos. Estas informações sugerem uma conclusão: o fenômeno da associação de cromossomos não se dá absolutamente ao acaso e ocorre com uma frequência significativamente superior ao esperado teórico (CORDEIRO DA SILVA, 1977).

Há, portanto, muitos aspectos a serem abordados por ocasião do estudo das associações de acrocêntricos. Inúmeros trabalhos são encontrados na literatura, a maioria versando sobre a ação de fatores específicos nas associações. O trabalho de COHEN & SHAW (1967) é de citação obrigatória pela importância que assume ao estabelecer os seguintes critérios para identificar uma associação: deve haver orientação dos acrocêntricos para um ponto comum através de suas extremidades satelitadas, e a distância entre as extremidades não deve ser maior do que o tamanho do braço longo de um cromossomo G da metáfase. Além disso, COHEN & SHAW (1967) fixaram certos parâmetros que têm sido utilizados em trabalhos que se propõem analisar as associações: (a) número de

associações por célula; (b) número de cromossomos associados por célula; (c) número de cromossomos por associação; (d) número de cromossomos D associados por célula; e (e) número de cromossomos G associados por célula. É evidente que com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico, os estudos tornaram-se mais precisos e novos parâmetros têm sido incorporados aos anteriores. Assim, por exemplo, podemos analisar o número de cromossomos 13 associados por célula, o de cromossomos 14, etc.

Um dos trabalhos sem identificação cromossômica é o de MATTEVI (1974), que classifica o estudo das associações de cromossomos metafásicos em dois grupos principais: aqueles elaborados em indivíduos normais da população e aqueles em pacientes com anomalias cromossômicas ou portadores de diferentes quadros clínicos. Este trabalho explora em sua Revisão os seguintes aspectos: posições relativas ocupadas pelos cromossomos na metáfase, composição das associações (números e tipos de cromossomos envolvidos nas mesmas), e influência de fatores que interferem na formação das associações - métodos de cultivo das células, tipos celulares, sexo e, mais especificamente, o fator idade, pelo comprometimento desta variável com o assunto do trabalho, *Efeitos da Senescência no Cariótipo Humano*. Entre os parâmetros estudados, o comportamento asso-

ciativo dos acrocêntricos foi o único que não se modificou com a senescência.

Uma extensa revisão é feita por CORDEIRO DA SILVA (1977), que caracteriza o fenômeno das associações de acrocêntricos sob diferentes aspectos, e salienta, entre outras, as seguintes conclusões: a principal causa das associações é a fusão nucleolar; as associações estão sob influência real do fator idade, de drogas e das técnicas de cultivo das células, enquanto os parâmetros sexo e raça não agem de modo efetivo; há uma pequena percentagem de indivíduos nos quais os padrões de associação diferem dos demais por apresentarem alterações em suas RON, nos satélites e no conteúdo de ADNr; este fenômeno favorece, em diferentes graus, translocações e não-disjunções (pelo menos um dos progenitores de indivíduos mongolóides, em geral, apresenta comportamento associativo diferente de seu controle).

De modo semelhante, FONTOURA Jr. (1979) revisa determinados aspectos já mencionados e estuda o comportamento associativo de cromossomos de índios Kaingã comparativamente ao de indivíduos da raça branca. Em relação à distribuição dos padrões de associações classificados por par cromossômico, o autor encontrou uma diferença altamente significativa na amostra branca.

Entre os trabalhos que analisam o processo das associações e que utilizam as técnicas de bandeamento cromossômico está o de MUTCHINICK (1976), que estudou uma amostra de 20 indivíduos, de ambos os sexos e de idades reconhecidas como de alto e baixo risco para não-disjunção meiótica. Apenas as associações em que participou no mínimo um cromossomo G foram consideradas, sendo analisadas 100 metáfases em cada caso. O autor concluiu que os cromossomos do grupo G, identificados pela técnica de G-bandeamento, não apresentavam padrões de associações dependentes da idade e do sexo dos indivíduos.

Um outro aspecto interessante a ser discutido nesta Revisão, e que aparece comentado nos trabalhos acima mencionados, diz respeito à casualidade, ou não, dos padrões de associação dos acrocêntricos. FERGUSON-SMITH & HANDMAKER (1961), que pela primeira vez descreveram o fenômeno da *associação de satélites*, nos mostraram que, embora não haja qualquer referência sobre a avaliação estatística de seus dados, as associações entre cromossomos de grupos diferentes (D-G) seriam tão frequentes quanto aquelas que envolviam cromossomos de um mesmo grupo (D-D e G-G). Evidentemente, esta afirmativa deve ser tomada com certa cautela, uma vez que os três tipos de associação não ocorrem com igual frequência, pois o número de cromossomos que com-

põe cada grupo é diferente (6 para o grupo D e 4 para o grupo G); além disto as associações D-D e G-G têm certas combinações menos frequentes (entre homólogos). A casualidade dos padrões de associação deve ser admitida quando os dados em questão estiverem de acordo com o esperado em termos probabilísticos. Nesse sentido, os resultados de COHEN & SHAW (1967) indicaram que os padrões para as associações múltiplas eram casuais, embora tenham observado uma frequência maior de cromossomos do grupo G nas associações simples (1,23G:1D).

Ainda sobre a participação dos acrocêntricos nas associações, os estudos de NAKAGOME (1969), SHAW et al. (1969) e CUEVAS-SOSA (1970) são igualmente indicativos de que esta participação se dá ao acaso. No entanto, devemos considerar que estes resultados foram obtidos a partir da análise de amostras que apresentam tamanho muito reduzido. Além disso, a heterogeneidade da amostra de NAKAGOME (1969), constituída de indivíduos normais e de portadores de anomalias cromossômicas e de idades variáveis, dificulta uma real avaliação de seus dados.

Com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico, a participação dos cromossomos nas associações pôde então ser avaliada não somente a nível de grupo (D-D, D-G e G-G), como também ao de tipos que compõem cada grupo (13-13, 13-14, 13-15, etc.). Assim,

JACOBS et al. (1976), ARDITO et al. (1978) e RAY & PEARSON (1979) concluíram que a frequência das associações D-D, D-G e G-G estaria de acordo com o esperado em termos probabilísticos (15:24:6, respectivamente). De modo semelhante, DENTON et al. (1976), que empregaram o método de coloração pela prata, analisaram 1000 associações de 118 indivíduos normais e demonstraram que as frequências de participação dos vários acrocêntricos nas associações simples e múltiplas não diferiram dos valores esperados pelo caso.

No entanto, parece-nos evidente que cada par de acrocêntricos teria uma chance particular de participação nas associações, reflexo da atividade de cada homólogo - o que MATTEVI (1974) chamou de *peculiaridades de comportamento cromossômico*. A possibilidade do reconhecimento de cada homólogo do par, pela presença de variantes morfológicas, permite a avaliação do comportamento associativo dos homólogos. Este é, em resumo, o objetivo do nosso trabalho, por isso, este aspecto será mais extensivamente discutido nesta Revisão.

Os primeiros trabalhos que indicam haver diferenças significativas entre as frequências de associação dos diversos pares de acrocêntricos datam do início desta década, o que coincide, tal como foi mencionado anteriormente, com o advento das técnicas de iden-

tificação cromossômica. Assim, PATIL & LUBS (1971), COOKE (1971 e 1972), ALFI & DONNELL (1972) e NAKAGOME (1973) observaram padrões não casuais de associação, específicos do indivíduo em estudo, e que refletiam a contribuição, em proporções constantes, dos pares de acrocêntricos. O trabalho pioneiro de PATIL & LUBS (1971) mostrou serem diferentes as frequências de associação dos pares de acrocêntricos, independentemente do fato de se tratar de associações simples ou múltiplas. Para este estudo, os autores utilizaram a técnica de fluorescência e analisaram 202 células de 11 indivíduos normais. Os achados de COOKE (1971) indicaram que o par 13 se associava com frequência maior em relação às dos outros pares do mesmo grupo, nos dois tipos de associações. O mesmo podemos dizer para o trabalho de ALFI & DONNELL (1972), quanto à participação do par 14. Os resultados de NAKAGOME (1973), por sua vez, revelaram um excesso do par 21, em associações que envolviam pelo menos um cromossomo do grupo G.

Por outro lado, os dados de GIGLIANI et al. (1972), ALFI & DONNELL (1972), CAPOA et al. (1973), SCHMID & KRONE (1974), PHILLIPS (1975), MUTCHINICK (1976), HAYATA et al. (1977) e CAPOA (1978) sugerem que os cromossomos, não como pares, mas individualmente, teriam padrões definidos de associação. SCHMID & KRONE (1974), por exemplo, através do emprego de métodos de fluores-

cência, determinaram as frequências individuais de associação de 64 acrocêntricos. Os marcadores utilizados - intensidade de fluorescência e tamanho das constrições secundárias - permitiram que se detectassem diferenças significativas nas frequências de associação entre homólogos de sete pares de acrocêntricos. Em geral, os cromossomos portadores de constrições nucleolares distintas se associavam mais frequentemente que aqueles onde não se reconheciam estas constrições.

Outra contribuição importante foi dada por HAYATA et al. (1977), que encontraram diferenças nas frequências de associação de homólogos onde um apresentava comprimento alterado da constrição nucleolar e, conseqüentemente, do tamanho das bandas reveladas por N-bandeamento. O homólogo marcador se associava preferencialmente, o que está de acordo com a conclusão de CAPOA et al. (1978), que admitiram que cromossomos com variantes apresentavam frequência de associação maior.

As baixas frequências com que cromossomos deficientes da região dos braços ou das constrições secundárias participam das associações sugerem que eles perderam pelo menos em parte, suas regiões organizadoras do nucléolo. CAPOA et al. (1976), através da análise de um cariótipo onde um dos cromossomos 15 apresentava ausência de satélites e de constrição secundária, ob-

servaram que este cromossomo nunca se corava com N-bandeamento e não aparecia envolvido em qualquer associação. Assim, de modo semelhante, se observado um aumento nas taxas de associação de cromossomos com satélites gigantes, pode-se supor que estes acrocêntricos seriam mais *eficientes* no processo de formação do nucléolo. De fato, os achados de ZANKL & ZANG (1974) revelaram que os cromossomos *Ds+* associavam-se além do esperado, indicando um comprometimento da região dos satélites com as RON. No entanto, em face da dificuldade de se distinguir satélites e RON quando aumentados, estes autores decidiram classificar estas situações como um único polimorfismo. Da mesma forma, MATTEI et al. (1976), sem diferenciar os vários tipos de variantes (verdadeiros *p+*, *s+* e *h+*), concluíram que a heterogeneidade de seus dados poderia explicar a não-concordância de seus resultados. MATTEI et al. (1976) encontraram que cromossomos de indivíduos portadores de variantes 21*p+*, 22*p+*, 13*p+* ou 15*p+* não se mostravam mais associados quando comparados, respectivamente, aos de indivíduos não portadores, o mesmo não ocorrendo para o par 14.

Ainda no que se refere à presença de variantes *p+* nos acrocêntricos, os estudos feitos por MILLER et al. (1978) em vários indivíduos normais, 14*p+*, que compõem três gerações de uma família, indicaram que, me-

diante tratamento com a prata, apareciam duas bandas de meio tamanho no braço curto dos acrocêntricos marcadores. Os resultados da análise do comportamento associativo destes cromossomos não se mostravam diferentes do esperado teórico, embora os métodos de hibridação *in situ* tenham revelado a presença de seis vezes mais grãos de prata sobre os cromossomos 14, quando comparados aos demais acrocêntricos.

Por outro lado, alguns trabalhos mais específicos apresentam resultados conflitantes: GIGLIANI et al. (1972), HENDERSON & ATWOOD (1976) e ARCHIDIACONO et al. (1977) encontraram igualmente correlação positiva entre quantidade de ADNr e frequência de participação de acrocêntricos com satélites duplos em associações; MOREIRA (1976) relatou três casos de indivíduos com variantes, 21ps+, 22ps+ e 15ps+, e testou a distribuição dos acrocêntricos marcadores comparada à de seus homólogos, não encontrando diferenças estatisticamente significantes.

Se por um lado, não há consenso de opinião por parte dos autores quanto à possível influência de variantes morfológicas sobre as frequências de associação - em face da heterogeneidade dos dados e resultados obtidos e da forma de classificar estas variantes - há, em função destes mesmo fatores, necessidade de novos estudos serem elaborados de maneira precisa e,

sempre que possível, com a adequada metodologia estatística. Assim, pretende este trabalho contribuir para o entendimento da importância de um fator específico, variação no tamanho dos satélites, no processo das associações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A idéia inicial deste projeto nasceu quando um exame de rotina do Laboratório de Citogenética da UFPR revelou a presença de satélites proeminentes em uma criança que apresentava graves distúrbios do SNC. Com o objetivo de se averiguar mais extensivamente o caso, vários outros membros da família do probando, todos fenotipicamente normais, foram cariotipados. Esta análise mostrou que a referida variante localizava-se no cromossomo 14, tendo sido encontrada em cinco membros através de três gerações. Uma tia-avó materna do propósito que morreu aos sete anos de idade, se constituiu em um dos indivíduos da amostra.

A partir de então, de acordo com os objetivos deste projeto, aqueles indivíduos normais e caucasóides que apresentassem a variante *satélites gigantes* eram selecionados, sendo que os dez indivíduos que

constituem nossa amostra pertencem a seis diferentes famílias.

O Quadro de Caracterização da Amostra por sexo, idade e cromossomo marcador está representado a seguir:

Quadro de Caracterização da Amostra

indivíduo	idade	sexo	cromossomo marcador
1	74	F	13*
2	34	M	21
3	37	F	13*
4	55	M	22**
5	24	F	22**
6	35	F	21***
7	37	M	21****
8	45	F	21****
9	11	F	21***
10	64	F	14

Obs.: Os indivíduos aparentados aparecem seguidos de asterisco (*); indivíduos com o mesmo número de asteriscos pertencem à mesma família.

Em seguida, são apresentadas fotos relativas ao par cromossômico do qual um dos homólogos possui a variante, por família estudada. À esquerda estão os cromossomos sem identificação (SIC), e à direita está o par identificado pela técnica de G-bandeamento (CIC) (Figura a).

As figuras b e c correspondem aos cromossomos do indivíduo nº 5, tomado como exemplo entre os indivíduos da amostra cujos cromossomos foram submetidos, respectivamente, às técnicas que revelam as bandas C e N. Na figura d são apresentadas as curvas obtidas através da microfotodensitometria dos cromossomos acrocêntricos do mesmo indivíduo e que correspondem aos da metáfase mostrada na figura b.

É importante que se observe além da sensibilidade da variante em estudo aos vários tipos de tratamento, que esta região se comporta densitometricamente de modo semelhante à região centromérica. Esta informação surge em função de que a curva correspondente ao cromossomo marcador apresenta dois picos, enquanto a dos demais acrocêntricos mostra um único pico, que corresponde à área do centrômero. Em Resultados e Discussão apresentamos uma série de considerações a respeito destes dados.

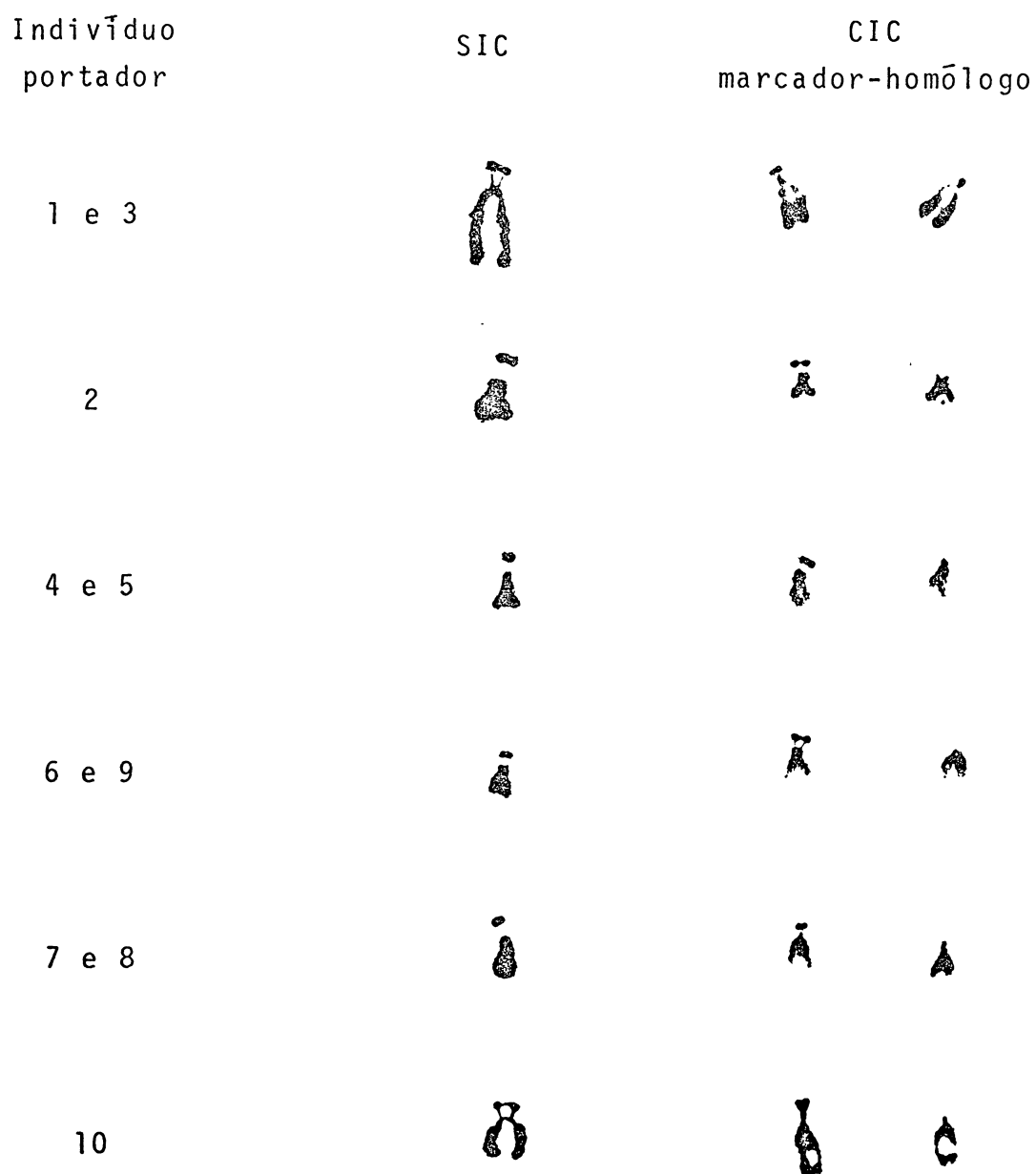


Fig. a: à esquerda, cromossomos portadores de variantes s^+ de cada uma das famílias estudadas, sem identificação (SIC); à direita, pares de cromossomos dos quais um dos homólogos é portador da variante s^+ , identificados pela técnica que revela as bandas G (CIC).

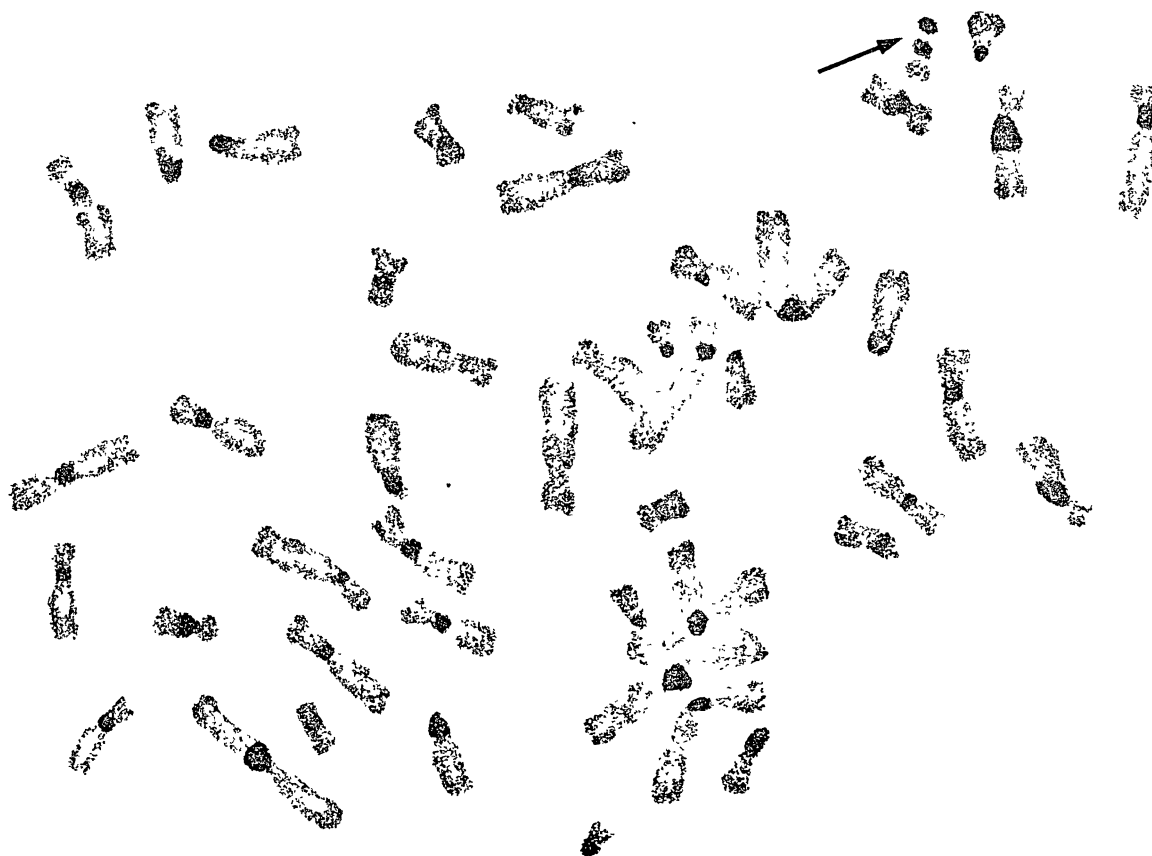


Fig. b: cromossomos metafásicos de um dos indivíduos da amostra (indivíduo nº 5), submetidos à técnica que revela as bandas C; a flecha indica o acrocêntrico do grupo G, portador de satélite gigante.

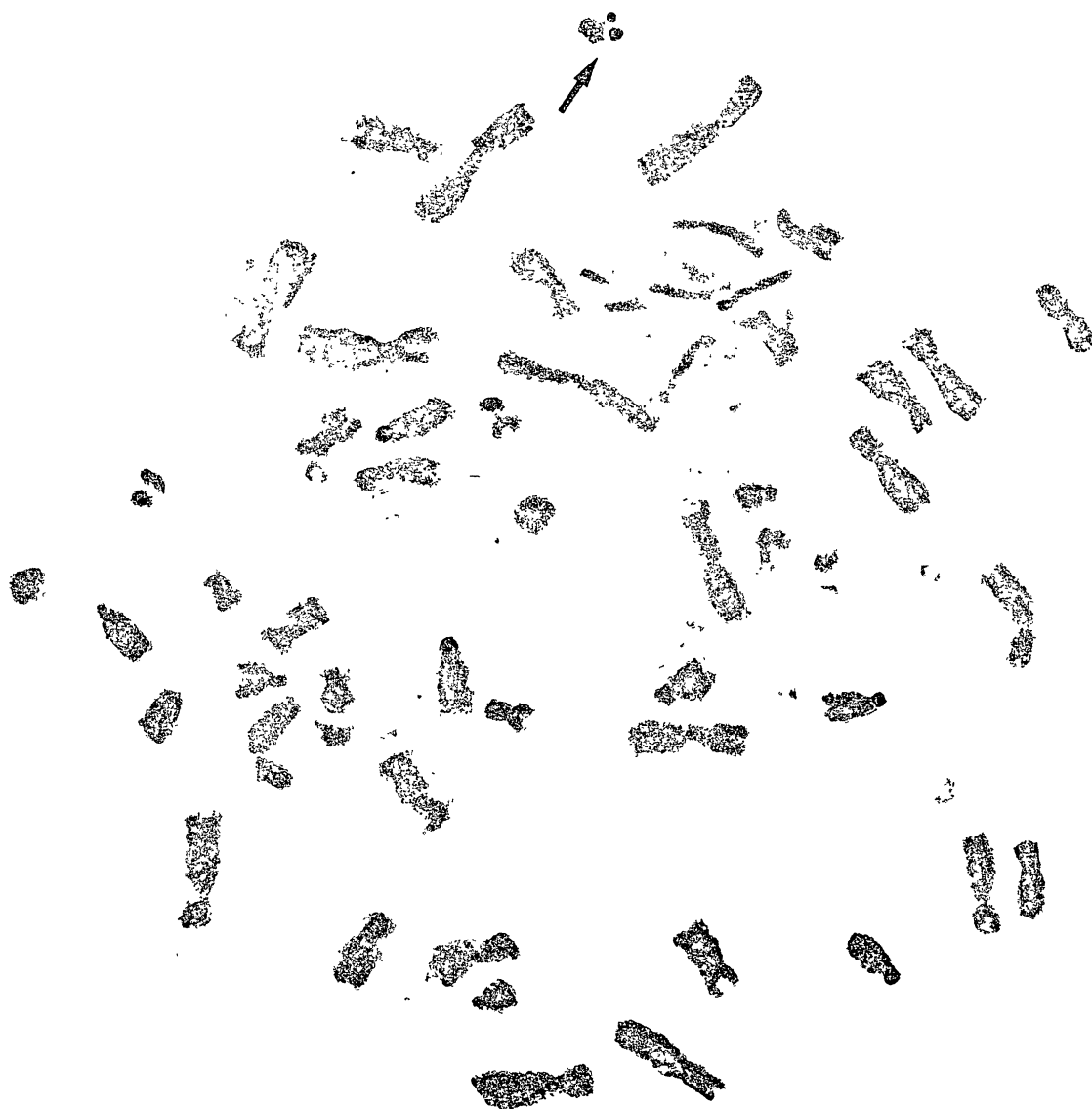


Fig. c: cromossomos metafásicos de um dos indivíduos da amostra (indivíduo nº 5), submetidos à técnica que revela as bandas N; a flecha indica o acrocêntrico do grupo G, portador de satélite gigante.

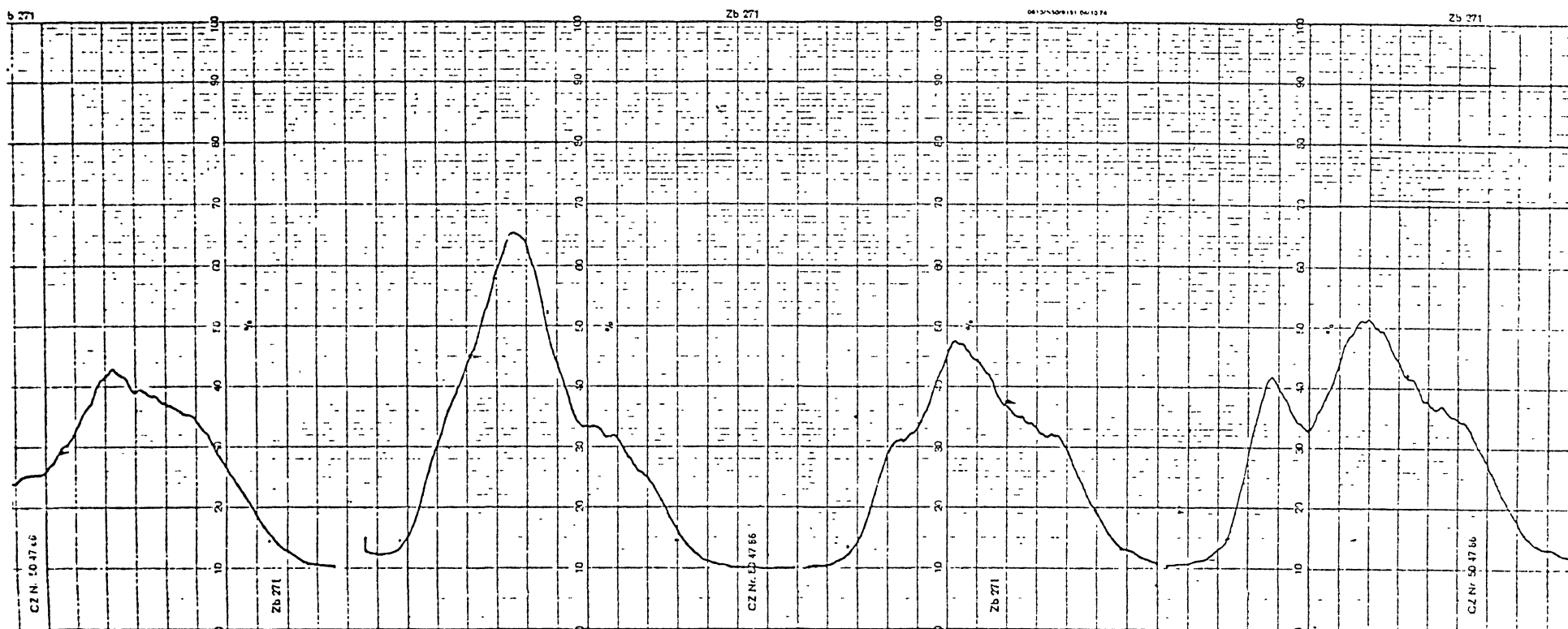


Fig. d: Curvas obtidas através da microfotodensitometria dos acrocêntricos autossômicos do grupo G de um dos indivíduos da amostra (indivíduo nº 5), portador de satélite gigante em um dos homólogos do par 22. À direita, está a curva do cromossomo marcador que apresenta dois picos: o primeiro deles (à esquerda) corresponde à área do satélite gigante, enquanto o segundo pico é correspondente, a exemplo dos demais cromossomos, à região centromérica.

ções);

- retirado o sobrenadante, era adicionado 1 ml de solução hipotônica de KCl (0,075 M a 37°C); após ressuspender lentamente, adicionavam-se mais 2 ml;

- após submetida a nova centrifugação (o tempo de hipotonia compreende o passo anterior e esta centrifugação, que somam 10 minutos), e retirado o sobrenadante, o material era fixado com metanol e ácido acético (na proporção de 3:1): de início, colocava-se 1 ml de fixador e, após ressuspender, completava-se com mais 2 ml, ressuspendendo novamente;

- centrifugado e retirado o sobrenadante, ao material eram acrescentados 3 ml de fixador; após ser ressuspendido, o material permanecia por 30 a 60 minutos em geladeira;

- passado o tempo de fixação, o material era submetido a uma nova centrifugação, e ao sedimento adicionavam-se 0,5 ml de fixador;

- as lâminas, previamente limpas e imersas em álcool absoluto, eram retiradas da geladeira a fim de que se distribuísse o material.

- secavam-se as lâminas e se distribuía o material que era seco naturalmente;

- em seguida, era feita a coloração com 1 ml de

Giemsa (Carlo Erba) colocado sobre a lâmina imersa em água por 5'.

3.3. TÉCNICAS DE BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

G-bandeamento:

Para a obtenção de bandas G, utilizamos a técnica desenvolvida por SBALQUEIRO (1977) que é uma variação da técnica originalmente descrita por SUMNER (1971) que consiste em:*

- incubar a lâmina em solução salina pH 9,2 de Na_2HPO_4 0,21 N + NaCl 0,9% (1:1) diluída em igual proporção de água desionizada, a 37°C por 5 a 10 minutos;

- rinsar em água desionizada;

- secar a temperatura ambiente;

- corar em Giemsa tamponado: solução de 3 partes de água desionizada e 1 parte de tampão fosfato pH 6,8 a 7,2 (Na_2HPO_4 M/15 + KH_2PO_4 M/15) por 3 a 5 minutos;

- rinsar em água desionizada;

- secar a temperatura ambiente;

* A idade ideal da lâmina, após a cultura, é de 15 a 30 dias; pode-se envelhecer a lâmina desidratando-a em estufa a 37° por uma semana.

- montar em permount.

C-bandeamento:

Para obtenção de bandas C, utilizamos a técnica de SUMNER (1972), que consiste em:*

- incubar a lâmina em HCl 0,2N por 30 minutos;
- incubar em $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5% a 60°C por 15 segundos;
- rinsar em água desionizada;
- incubar em solução de 2SSC a 60°C por 60 minutos;
- rinsar em água desionizada;
- corar em Giemsa tamponado: solução de 3 partes de água desionizada e 1 parte de tampão fosfato pH 6,8 por 5 minutos;
- rinsar em água desionizada;
- secar a temperatura ambiente;
- montar em permount.

N-bandeamento:

Para obtenção de bandas N, utilizamos a técnica de FUNAKI, MATSUI & SASAKI (1975) que consiste

* A idade ideal da lâmina, após a cultura, é de 10 a 15 dias.

em: *

- hidratar as lâminas em água destilada por 15 minutos a temperatura ambiente;
- incubar em solução pH 4,2 de NaH_2PO_4 1M a 95°C por 15 minutos;
- rinsar em água desionizada;
- corar em Giemsa tamponado: solução de 3 partes de água desionizada e 1 parte de tampão fosfato pH 6,8 a 7,2 por 20 minutos;
- rinsar em água desionizada;
- montar em permount.

3.4. TÉCNICA DE FOTOGRAFIA

As metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio ótico Leitz com filme *high contrast* 12 ASA, objetiva 100, filtro verde e sem contraste de fase. A revelação e fixação dos filmes assim com a ampliação, revelação e fixação das fotos foram feitas segundo a metodologia convencional.

* A idade ideal da lâmina, após a cultura, é de até 30 dias.

3.5. ANÁLISE CITOGENÉTICA

Critério para identificação do cromossomo marcador:

Neste trabalho foi adotado o critério estabelecido por LUBS & RUDDLE (1970), que considera gigante o satélite que se apresenta maior do que o tamanho do braço curto do cromossomo portador.

Critérios para identificação de associação:

A identificação das associações foi feita segundo os critérios estabelecidos por COHEN & SHAW (1967), que consideram associados os acrocêntricos que (a) estejam orientados para um ponto comum através de suas extremidades satelitadas e que (b) não estejam separados por uma distância, entre estas extremidades, maior que o braço longo de um acrocêntrico G da metáfase.

3.6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Em função da aparente descontinuidade dos dados referentes à frequência dos diferentes tipos de associação, nossa primeira preocupação foi testar a normalidade neste grupamento de dados. Para isso, utili-

zamos o teste do χ^2 , onde as freqüências esperadas para os diferentes intervalos de classe foram obtidos através do teste de Z. Os dados originais foram corrigidos para $\sqrt{x+1}$, onde x é igual a freqüência observada.

Nos dados de freqüência de associação simples, foi efetuada uma análise de variância (classificação hierárquica) segundo o delineamento inteiramente casualizado, onde consideramos o seguinte modelo matemático misto:

$$Y_{ijk} = m + g_i + t_{j(i)} + e_{ijk}, \text{ onde}$$

Y_{ijk} = valor fenotípico da associação k do tipo j do grupo i;

m = valor fenotípico médio do caráter em estudo;

g_i = efeito genético inerente ao grupo i;

$t_{j(i)}$ = efeito genético inerente ao tipo j do grupo i;

e_{ijk} = desvio aleatório do valor fenotípico Y_{ijk} definido pelo modelo.

Utilizando-se da metodologia desenvolvida por

BENNETT & FRANKLIN (1963), foram deduzidas as esperanças matemáticas dos quadrados médios da análise de variância, apresentadas abaixo:

F.V.	G.L.	$\hat{E}(Q.M.)$	Q.M.	F
G	I-1	$\sigma^2 + 10\sigma_{t:g}^2 + 10 K V_g$	Q_3	$Q_3:Q_2$
T/G	J-3	$\sigma^2 + 10\sigma_{t:g}^2$	Q_2	$Q_2:Q_1$
T/G ₁	J ₁ -1	$\sigma^2 + 10\sigma_{t:g_1}^2$	$Q_{2.1}$	$Q_{2.1}:Q_1$
T/G ₂	J ₂ -1	$\sigma^2 + 10\sigma_{t:g_2}^2$	$Q_{2.2}$	$Q_{2.2}:Q_1$
T/G ₃	J ₃ -1	$\sigma^2 + 10\sigma_{t:g_3}^2$	$Q_{2.3}$	$Q_{2.3}:Q_1$
Indivíduos/T/G		σ^2	Q_1	

onde

F.V. = fonte de variação;

G.L. = número de graus de liberdade;

$\hat{E}(Q.M.)$ = esperança matemática dos quadrados médios;

G = grupos: g_1 -D-D; g_2 -D-G; g_3 -G-G;

T = tipos de associação, por exemplo, 13-14;

/ = dentro, por exemplo, T/G - entre tipos dentro de grupos;

I = número de grupos;

J = número de tipos = $J_1 + J_2 + J_3$;

K = número de indivíduos;

σ^2 = variância entre indivíduos, dentro de tipos,
dentro de grupos;

$\sigma^2_{t:g}$ = variância entre tipos, dentro de grupos;

V_g = variância entre grupos.

Para casos em que verificamos significância dos valores de F , completamos a análise utilizando o teste de Tukey (Pimentel Gomes, 1970), que estabelece as diferenças mínimas significativas.

Nos dados relativos à frequência de associação de cada par cromossômico, assim como naqueles relativos à frequência de associação do cromossomo marcador e do respectivo homólogo, procedemos a análise de variância segundo o delineamento de blocos casualizados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um aspecto freqüentemente investigado, quando do estudo das associações de acrocêntricos, é o da casualidade, ou não, dos padrões de associações existentes, classificados segundo grupo e par cromossômico. Muitos são os autores, tal como indica a literatura, em parte citada na Revisão deste trabalho, que sustentam uma ou outra tese. Assim, por exemplo, os resultados de FERGUSON-SMITH & HANDMAKER (1961); COHEN & SHAW (1967); NAKAGOME (1969); SHAW et al. (1969); CUEVAS-SOSA (1970); DENTON et al. (1976); JACOBS et al. (1976) e de ARDITO et al. (1978) confirmam a primeira hipótese, enquanto os de ZANG & BACK (1968); PATIL & LUBS (1971); ALFI & DONNELL (1972); COOKE (1972); NAKAGOME (1973) e de MUTCHINICK (1976), entre outros, suportam a hipótese da participação não-casual dos acrocêntricos nas associações.

O fenômeno da associação envolve diferentes combinações de cromossomos acrocêntricos (D e/ou G), sendo que uma associação reconhecida como D-D quando

identificada pelas técnicas de bandeamento cromossômico, pode envolver o par 13, o par 14, o par 15 ou os acrocêntricos 13-14, 13-15 ou 14-15. Em nosso trabalho, pudemos observar combinações envolvendo 2, 3, 4, 5, 6 e até 7 cromossomos, mas com frequências nitidamente diferentes. Um fenômeno celular observado, relacionado com a fisiologia destes cromossomos, é que as associações múltiplas são mais raras. De fato, a participação de três ou mais cromossomos nas associações é um evento pouco frequente, pois quanto maior o número de cromossomos por associação, menor é a frequência com que esta ocorre (FERGUSON-SMITH & HANDMAKER, 1961; COOKE, 1972; MUTCHINICK, 1976; LIEN et al., 1977 e FONTOURA Jr., 1979). De acordo com os dados de MUTCHINICK (1976) e de LIEN et al. (1977), as associações múltiplas se constituíam somente em cerca de 21,2 e 24%, respectivamente, do total das associações observadas. Em vista disso, muitos trabalhos utilizam, para fins de análise, preferencialmente as associações simples (ZANG & BACK, 1968; NAKAGOME, 1973; MATTEI et al., 1976; ARDITO et al., 1978 e RAY & PEARSON, 1979).

A análise dos nossos dados revelou que muitas das combinações teoricamente possíveis não foram observadas - à medida que aumenta o número de combinações identificáveis, aumenta a dispersão das observações - e que as associações simples perfazem o equiva-

lente a 70% do total das associações. Considerando, portanto, o nosso objetivo inicial de investigar a participação dos diversos tipos de associações (conforme os cromossomos envolvidos) nos vários indivíduos da amostra e, ainda, as duas informações mencionadas acima, é que utilizamos para análise somente as associações simples, cujas frequências encontram-se representadas na Tabela 1.

Com o objetivo de observarmos a normalidade dos referidos dados procedemos, tal como mostra a Tabela 2, ao cálculo do valor do χ^2 .

O valor do χ^2 calculado, igual a 15,36 ($P < 0,01$), é significativo, mostrando que os dados não têm uma distribuição normal. Conseqüentemente, estes devem ser corrigidos para posterior análise de variância.

A apresentação dos dados, já corrigidos, encontra-se na Tabela 3, enquanto na Tabela 4, a exemplo da 2, está o processo do cálculo do χ^2 feito com o objetivo de verificarmos se a normalidade foi atingida. O valor do χ^2 , igual a 6,87, não significativo, nos indica que os dados agora apresentam uma distribuição normal.

Na Tabela 5, é apresentada a análise de variância das frequências de associações simples, onde o valor de F para grupos (G), igual a 2,5398, não se mostrou significativo. Em números absolutos, os três gru-

Tabela 2: Distribuição dos dados em função do intervalo de classe considerado com a respectiva frequência observada (F.O.) e a frequência esperada (F.E.) , assim como o desvio (d) e o conseqüente valor do χ^2 .

Intervalo de Classe	F.O.	F.E.	d	d ²	d ² /F.E.
< 0,5	49	34,74	14,26	203,35	5,85
(0,5 - 1,5)	30	30,69	-0,69	0,48	0,02
(1,5 - 2,5)	23	33,59	-10,59	112,15	3,34
(2,5 - 3,5)	20	26,65	-6,65	44,22	1,66
(3,5 - 4,5)	13	15,39	-2,39	5,71	0,37
(4,5 - 5,5)	11	6,47	4,53	20,52	3,17
> 5,5	04	2,47	1,53	2,34	0,95
Total	150			$\chi^2 = 15,36^{**}$	

****** significativo a 1%.

Tabela 3: Frequência corrigida dos diferentes tipos de associação simples de cada grupo nos dez indivíduos estudados.

Grupo	Tipo	I n d i v í d u o s										Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
D:D	13:13	1,73	1,00	1,41	1,41	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,41	11,96
	13:14	1,73	2,00	2,24	1,73	1,00	1,73	2,24	2,00	1,41	2,45	18,53
	13:15	1,73	1,73	2,65	1,00	1,73	1,41	2,24	1,41	1,00	2,00	16,90
	14:14	1,00	1,41	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,73	1,00	1,41	11,55
	14:15	2,45	1,00	1,00	1,73	2,00	2,00	1,41	2,65	1,41	2,00	17,65
	15:15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,41	1,00	1,00	1,00	1,00	10,41
D:G	13:21	1,00	1,73	1,00	1,73	1,41	1,73	2,00	2,00	2,24	2,00	16,84
	13:22	2,00	1,41	2,00	2,45	2,00	2,45	1,73	1,41	1,73	2,00	19,18
	14:21	2,24	2,45	1,73	1,73	1,00	1,41	1,41	1,41	1,00	1,41	15,79
	14:22	1,00	1,73	1,41	1,41	2,24	2,00	2,45	2,24	2,00	2,24	18,72
	15:21	2,00	2,24	1,00	2,00	2,45	2,65	1,73	2,00	2,24	2,00	20,31
	15:22	1,41	1,41	1,00	1,00	1,73	2,00	2,45	1,00	1,73	2,45	16,18
G:G	21:21	1,00	1,41	1,41	1,41	2,24	1,41	1,41	1,00	1,00	1,73	14,02
	21:22	1,00	2,45	1,41	1,00	2,65	1,73	1,00	2,24	2,45	1,41	17,34
	22:22	1,00	1,00	1,00	2,24	1,41	1,00	1,00	1,73	1,00	1,00	12,38
Total		22,29	23,97	21,26	22,84	24,86	24,93	24,07	24,82	22,21	26,51	237,76

Tabela 4: Distribuição dos dados corrigidos em função do intervalo de classe considerado com a respectiva frequência observada (F.O.) e a frequência esperada (F.E.), assim como o desvio (d) e o conseqüente valor de χ^2 .

Intervalo de Classe	F.O.	F.E.	d	d ²	d ² /F.E.
< 1,25	49	38,82	10,18	103,63	2,67
(1,25 - 1,50)	30	26,38	3,62	13,10	0,50
(1,50 - 1,75)	23	28,53	-5,53	30,58	1,07
(1,75 - 2,00)	20	24,52	-4,52	20,43	0,83
(2,00 - 2,25)	13	16,80	-3,80	14,44	0,86
(2,25 - 2,50)	11	9,14	1,86	3,46	0,38
> 2,50	04	5,80	-1,80	3,24	0,56
Total	150			$\chi^2 = 6,87^{ns}$	

ns: não significativo.

Tabela 5: Análise de variância dos dados relativos à frequência de associações simples.

⁺ Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Grupos (G)	2	3,9454	1,9727	2,5398 ^{ns}
Tipos/Grupos (T/G)	12	9,3206	0,7767	3,9287**
Tipos/Grupo ₁ (T/G ₁)	5	6,3806	1,2761	6,4547**
Tipos/Grupo ₂ (T/G ₂)	5	1,6629	0,3326	1,6823 ^{ns}
Tipos/Grupo ₃ (T/G ₃)	2	1,2771	0,6836	3,2301**
Indivíduos/Tipo/Grupo	135	26,6945	0,1977	
T o t a l	149	39,9605		

c.v. = 28,06%

ns : não significativo.

** : significativo a 1%.

+ : a simbologia utilizada encontra-se em Material e Métodos.

pos (D-D, D-G e G-G) aparecem com frequências diferentes (Figura 1); no entanto, quando ponderados pelo número de tipos de associação que compõem cada um deles (6,6 e 3), estas diferenças diminuem (Figura 2). A maior frequência do grupo D-G permanece (embora estatisticamente, esta frequência não seja diferente das demais), em razão de este grupo não conter nenhum tipo de associação entre cromossomos homólogos, normalmente mais raras. Os trabalhos de MATTEI et al. (1976), ARDITO et al. (1978) e de RAY & PEARSON (1979) fazem referência ao fato de que há somente uma combinação possível que resulta de associação entre cromossomos homólogos, enquanto há quatro combinações possíveis que resultam de associação entre cromossomos heterólogos. Esta constatação levou MATTEI et al. (1976) a considerar, em seu trabalho, uma nova hipótese para testar a distribuição dos diferentes tipos de associações simples.

O valor de F para *tipos dentro de grupos* (T/G), igual a 3,9287, mostrou significância a nível de 1%, o que revela participarem os tipos de associação que compõem os grupos com frequências diferentes. Uma vez desdobrado o efeito T/G em tipos dentro do grupo₁ (D-D), do grupo₂ (D-G) e do grupo₃ (G-G), os valores de F, iguais a 6,4547, 1,6823 e 3,2301, respectivamente, mostram que, com exceção do grupo₂, houve signifi-

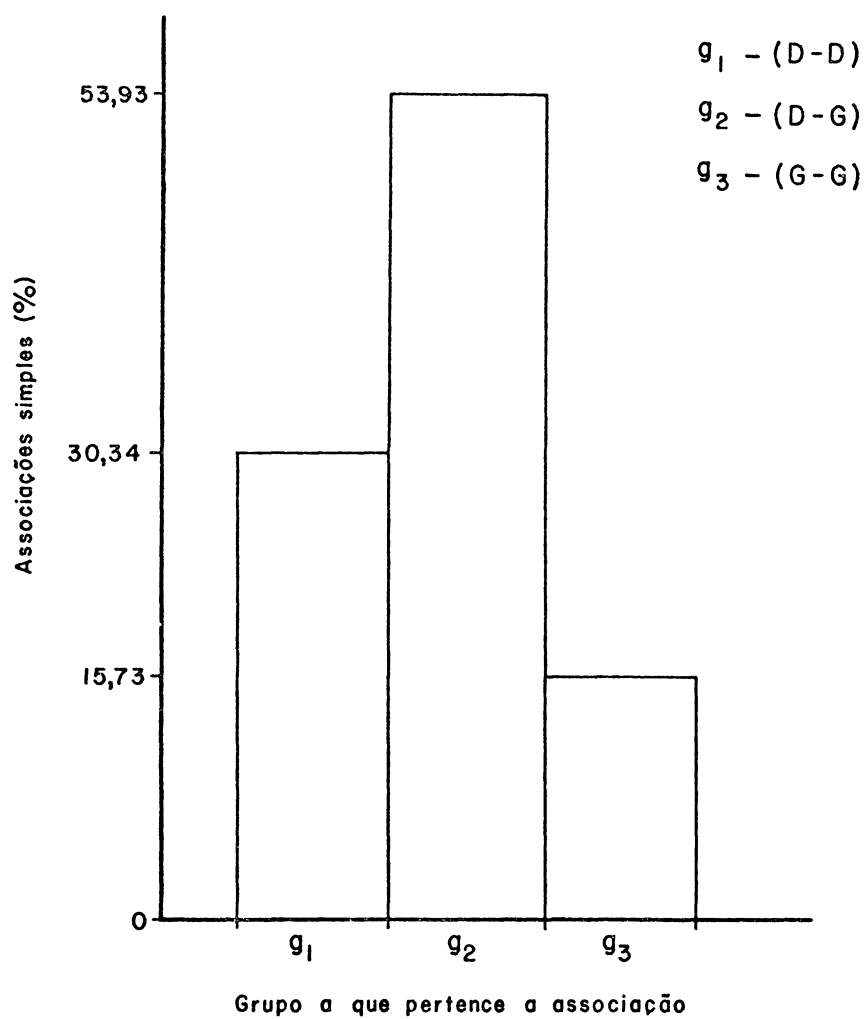


Fig. 1: Frequência (em %) de associações simples, segundo o grupo a que pertencem.

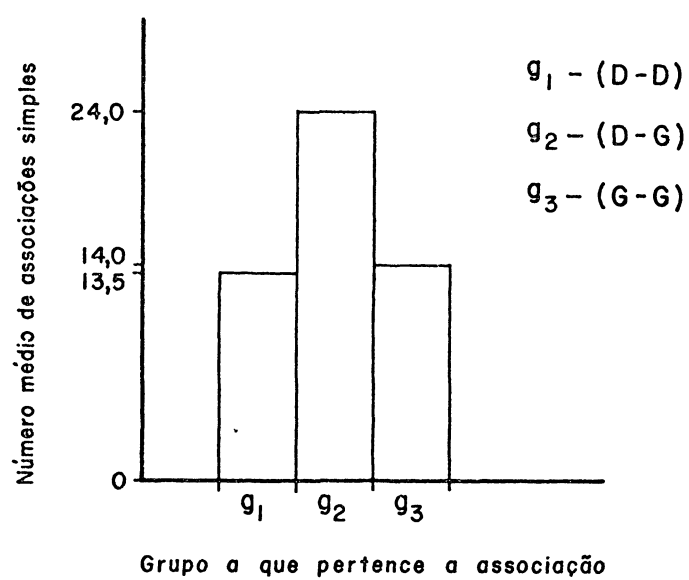


Fig. 2: Número médio de associações simples, segundo o grupo a que pertencem.

cância a nível de 1%. Isto indica que, estatisticamente, os diferentes tipos de associação do grupo₂ (D-G) participam dele com igual freqüência, o que não ocorre com os demais (Figuras 3, 4 e 5).

A fim de detectarmos quais os tipos dentro dos grupos 1 e 3 que aparecem com freqüências diferentes, utilizamos o teste de Tukey, representado na Tabela 6. O valor de Δ , diferença mínima significativa, calculado para o grupo₁, foi de 0,5753, e para o grupo₃ de 0,4716, ambos a nível de 5% de probabilidade.

Através da observação gráfica, contida na mesma tabela, pudemos constatar que as associações entre homólogos são menos freqüentes que as entre heterólogos, confirmando portanto o que foi dito anteriormente, e o esperado em termos probabilísticos.

É importante a observação de que das 15 comparações possíveis entre os tipos de associações do grupo₁, 3 são entre associações homólogas, as quais não apresentaram diferenças significativas; 3 são entre associações heterólogas, que também não apresentaram diferenças significativas, e 9 envolvem comparações entre uma associação homóloga e outra heteróloga, das quais 3 (13-13 x 13-15; 13-13 x 14-15 e 13-15 x 14-14) não mostraram diferenças significativas. É estranho, de acordo com o esperado probabilístico, o fato de as 3 últimas comparações não se mostrarem diferentes. No en-

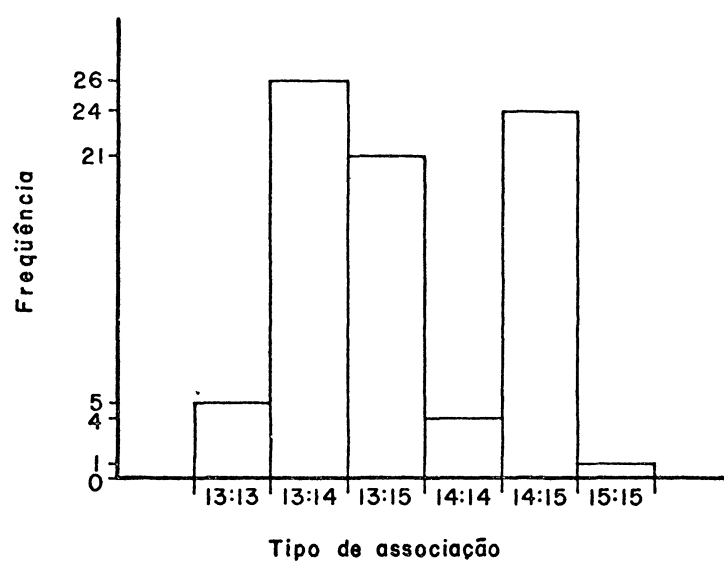


Fig. 3: Frequência dos diferentes tipos de associação simples do grupo₁ (D-D).

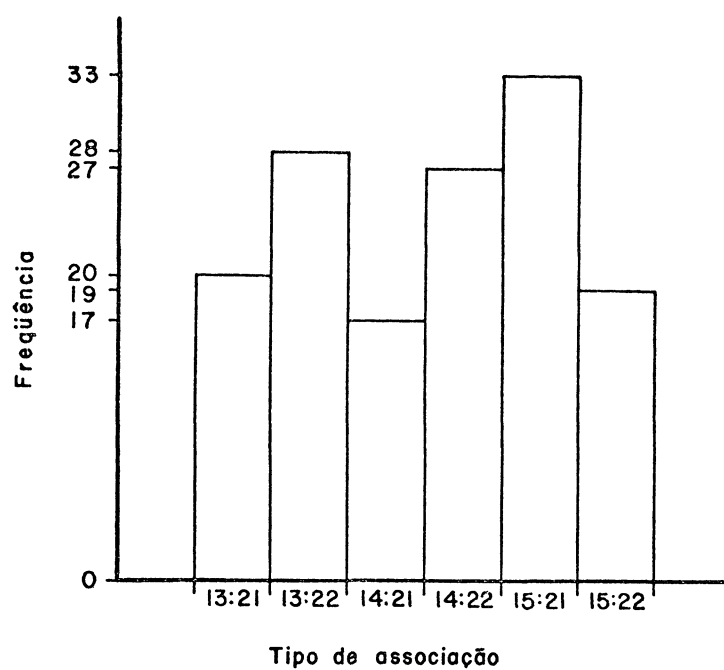


Fig. 4: Frequência dos diferentes tipos de associação simples do grupo₂ (D-G).

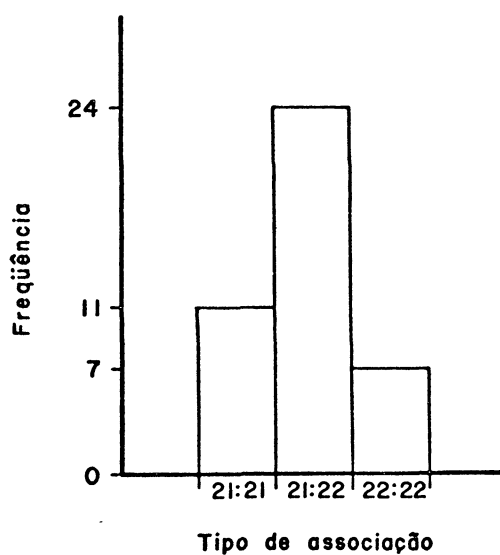


Fig. 5: Frequência dos diferentes tipos de associação simples do grupo₃ (G-G).

Tabela 6: Frequência média de associação corrigida dos diversos tipos de associações de acro-cêntricos dos grupos g_1 (D-D) e g_3 (G-G), assim como o valor de Δ a 10,5 e 1% de probabilidade do teste Tukey. Os traços contínuos unem médias que não apresentam diferenças significativas.

Tipos de associações do grupo G_1 (D:D)	Médias	$\Delta 10\% = 0,5190$	$\Delta 5\% = 0,5753$	$\Delta 1\% = 0,6829$
13:14	1,853			
14:15	1,765			
13:15	1,690			
13:13	1,196			
14:14	1,155			
15:15	1,041			
Tipos de associações do grupo G_3 (G:G)	Médias	$\Delta 10\% = 0,4115$	$\Delta 5\% = 0,4716$	$\Delta 1\% = 0,5892$
21:22	1,734			
21:21	1,402			
22:22	1,238			

tanto, é prematuro falar na existência de associações preferenciais em nossa amostra, uma vez que, se relaxado o limite de significância (10%), uma destas diferenças aparece, sugerindo um possível efeito de amostragem.

A mesma análise pode ser feita para as 3 comparações possíveis entre os tipos de associação do grupo₃, onde uma das comparações entre cromossomos heterólogos não apresentou diferença significativa (21-21 x 21-22).

Há alguns trabalhos cujos resultados, embora não desviem significativamente dos valores esperados, sugerem a existência de associações preferenciais. NAKAGOME (1973) encontrou que as associações que envolviam o par 21 eram mais frequentes que aquelas que envolviam o par 22. RAY & PEARSON (1979) salientaram que o tipo de associação 15-22 apresentava uma tendência maior de se associar. Por outro lado, MUTCHINICK (1976) encontrou diferenças significativas entre as frequências dos tipos de associação que envolviam dois cromossomos homólogos e entre as frequências dos tipos de associação que envolviam dois cromossomos heterólogos. Através de um teste de Tukey, este autor detectou os seguintes contrastes significativos: 21-21 > 22-22 e 21-14; 21-22 e 22-14 > 21-15.

Em seguida, passamos à consideração dos valores

dos quadrados médios e das respectivas esperanças matemáticas (conforme observado em Métodos) que permitem estimar os valores de cada componente da variância fenotípica do caráter *freqüência de associação de acrocêntricos*, representada da seguinte maneira:

$$\sigma_F^2 = \hat{\sigma}_{t:g}^2 + \hat{V}_g + \hat{\sigma}^2$$

Os valores encontrados (para $\hat{\sigma}^2 = 0,1977$; para $\hat{\sigma}_{t:g}^2 = 0,0579$, e para $\hat{V}_g = 0,0266$) permitiram-nos calcular os seguintes coeficientes de determinação genotípica:

$$\text{cdg para grupos} = \frac{\hat{V}_g}{\sigma_F^2} = \frac{0,0266}{0,2822} \cdot 100 = 9,43\%$$

$$\text{cdg para tipos/grupos} = \frac{\hat{\sigma}_{t:g}^2}{\sigma_F^2} = \frac{0,0579}{0,2822} \cdot 100 = 20,52\%$$

Tais resultados nos mostram o quanto os fatores, *grupos* (9,43%) e *tipos/grupos* (20,52%) colaboram para a variação total observada. Cerca de 70,05% das variações observadas possuem causas que não se devem ao fato de a associação pertencer a um determinado grupo ou, mesmo, aos tipos que a compõem, o que poderia explicar a não-concordância dos resultados da literatura, desde que esta informação, relacionada com a her-

dabilidade, pudesse ser extrapolada.

De acordo com a literatura, a casualidade dos padrões de associação tem sido investigada através de diferentes formas. Assim, o estudo de frequência das associações simples ou ainda, o da participação de cada par cromossômico no total das associações, são duas maneiras de averiguar este tema, abordadas neste trabalho. A participação dos cromossomos aos pares, em todos os indivíduos, está representada na Tabela 7. A análise, feita segundo delineamento para blocos casualizados, está contida na Tabela 8, e nos revelou que os indivíduos não diferem em relação às suas frequências de associação ($F = 0,9996$, não significativo), e que os pares de cromossomos participam de maneira igual destas associações ($F = 0,6863$, não significativo), sendo a frequência do par 21 ligeiramente maior (Figura 6). Estes achados contrariam os de PATIL & LUBS (1971) e os de ARDITO et al. (1978), que admitem participação preferencial dos pares de acrocêntricos nas associações (aquelas publicações, assim como este trabalho, utilizam para fins de análise as associações simples e múltiplas). Este fato pode ser explicado por nossa amostra ser constituída de indivíduos de sexo e idades diferentes, além de apresentar a variante $s+$, localizada em diferentes pares de cromossomos. Esta série de variáveis poderia estar atuando

Tabela 7: Frequência de associação observada e corrigida de cada par cromossômico em cada um dos indivíduos da amostra.

Indivíduo	P a r C r o m o s s ô m i c o										Total	
	13		14		15		21		22			
	observ.	corrig.	observ.	corrig.	observ.	corrig.	observ.	corrig.	observ.	corrig.	observ.	corrig.
1	29	5,4772	18	4,3589	16	4,1231	13	3,7417	07	2,8284	83	20,5293
2	13	3,7417	14	3,8730	09	3,1623	23	4,8990	10	3,3166	69	18,9926
3	22	4,7958	11	3,4641	12	3,6056	06	2,6458	06	2,6458	57	17,1571
4	19	4,4721	09	3,1623	10	3,3166	20	4,5826	17	4,2426	75	19,7762
5	07	2,8284	08	3,0000	14	3,8730	21	4,6904	18	4,3589	68	18,7507
6	15	4,0000	15	4,0000	20	4,5826	25	5,0990	18	4,3589	93	22,0405
7	18	4,3589	22	4,7958	18	4,3583	17	4,2426	22	4,7958	97	22,5514
8	13	3,7417	24	5,0000	13	3,7417	14	3,8730	19	4,4721	83	20,8285
9	11	3,4641	14	3,8730	13	3,7417	16	4,1231	17	4,2426	71	19,4445
10	20	4,5826	18	4,3589	18	4,3589	16	4,1231	04	2,2361	76	19,6596
Total	167	41,4625	153	39,8860	143	38,8638	171	42,0203	138	37,4978	772	199,7304

Tabela 8: Análise de variância segundo o delineamento para blocos ao acaso, dos dados relativos à frequência de associação de cada par cromossômico.

⁺ Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Cromossomos	4	1,3771	0,3443	0,6803 ^{ns}
Indivíduos	9	4,5529	0,5059	0,9996 ^{ns}
Resíduo	36	18,2204	0,5061	
Total	49	24,1504		

c.v. = 17,81%

ns : não significativo.

+ : a simbologia utilizada encontra-se em Material e Métodos.

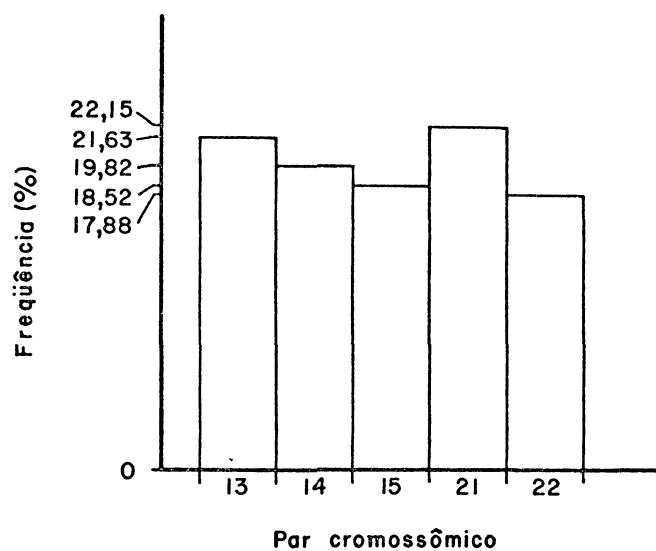


Fig. 6: Frequência (em %) de associações simples e múltiplas em que participam os diferentes pares cromossômicos.

no sentido de *mascarar* a participação preferencial de determinados pares cromossômicos. Em uma amostra, onde as condições acima mencionadas fossem observadas, e além disso todos os indivíduos tivessem a variante no mesmo par cromossômico, os resultados poderiam se mostrar diferentes.

O objetivo principal que se propõe este trabalho é a investigação do comportamento de cromossomos portadores de variantes *s+*, em termos de associação. Antes disso, nossa preocupação foi *caracterizar* a amostra de forma a conhecermos o comportamento das associações simples e dos diferentes pares cromossômicos nos vários indivíduos estudados.

Em seguida, com o objetivo de verificarmos a existência, ou não, de diferença entre as frequências de associação dos cromossomos marcadores e a de seus homólogos, procedemos à análise dos dados contidos na Tabela 9 (associações simples e múltiplas), feita de maneira semelhante à anterior.

Na Tabela 10, encontram-se os resultados da análise dos dados relativos à frequência de associação do cromossomo marcador e à de seu homólogo. O valor de **F** para *indivíduos*, igual a 0,3209, não significativo, nos indicou que os dez indivíduos da amostra não diferem em relação às suas frequências de associação dos pares de cromossomos onde um dos homólogos apresenta a va-

Tabela 9: Frequência de associação observada e corrigida do cromossomo marcador e do respectivo homólogo em cada um dos indivíduos da amostra.

Indivíduos	Cromossomo marcador		Cromossomo homólogo		Total	
	Observada	Corrigida	Observada	Corrigida	Observada	Corrigida
1	20	4,5826	09	2,3629	29	6,9453
2	11	3,4641	12	3,6056	23	7,0697
3	13	3,7417	09	3,1623	22	6,9040
4	14	3,8730	03	2,0000	17	5,8730
5	11	3,4641	07	2,8284	18	6,2925
6	10	3,3166	15	4,0000	25	7,3166
7	15	4,0000	02	1,7321	17	5,7321
8	10	3,3166	04	2,2361	14	5,5527
9	09	3,1623	07	2,8284	16	5,9907
10	07	2,8284	11	3,4641	18	6,2925
Total	120	35,7494	79	28,2197	199	63,9691

Tabela 10: Análise de variância segundo o delineamento para blocos ao acaso, dos dados relativos à frequência de associação do cromossomo marcador e do respectivo homólogo em cada um dos indivíduos da amostra.

⁺ Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Indivíduos	9	1,7361	0,1929	0,3209 ^{ns}
Par com variante	1	2,8348	2,8348	4,7160 ^{ns}
Resíduo	9	5,4099	0,6011	
Total	19	9,9808		

c.v. = 24,24%

ns : não significativo.

+ : a simbologia utilizada encontra-se em Material e Métodos.

riante. Algumas publicações, no entanto, indicam a existência de padrões típicos de associações por indivíduo, ou seja, que a *propriedade de associar-se* seria uma característica de cada cromossomo em cada indivíduo (ZANG & BACK, 1968; SCHMID & KRONE, 1974 e MATTEI et al., 1976). O valor de F para *par com variante*, igual a 4,7160, sugere a existência de uma diferença entre a frequência de associação do cromossomo marcador e a de seu homólogo ($0,05 < P < 0,1$). Este resultado é indicativo de um possível efeito, a nível celular, desta variante (Figura 7).

Observe-se ainda que os nossos achados estão na direção daqueles que indicam que cromossomos portadores de variantes *p+* se associam preferencialmente, seja a variante relativa ao tamanho aumentado do braço curto, da constrição nucleolar ou dos satélites dos acrocêntricos (GIGLIANI et al., 1972; SCHMID & KRONE, 1974; ZANKL & ZANG, 1974; HENDERSON & ATWOOD, 1976; HAYATA et al., 1977 e CAPOA et al., 1978). É importante salientar que, embora basicamente os objetivos destes trabalhos sejam comuns, muitas destas publicações apresentam abordagens diferentes. Algumas delas compararam indivíduos portadores e não-portadores de variantes entre si, quanto às suas frequências de associação; outras analisam a participação de pares de cromossomos marcadores e não-marcadores nas associações

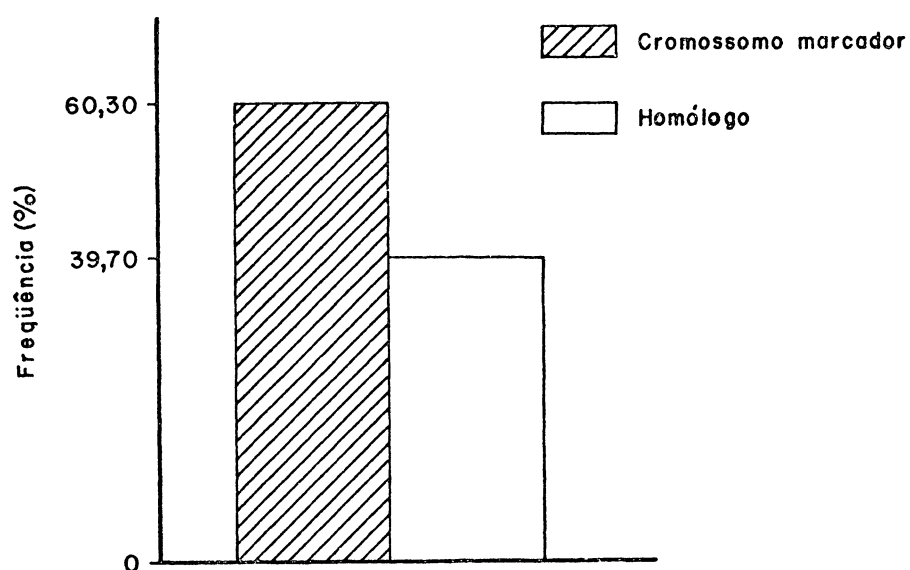


Fig. 7: Frequência (em %) de associações simples e múltiplas em que participam o cromossomo com a variante (marcador) e o seu homólogo.

de um indivíduo, e há ainda aqueles trabalhos, inclusive este, que tratam da comparação específica entre dois cromossomos homólogos, onde um é heteromórfico.

Uma das preocupações que tivemos, quando da elaboração da Revisão deste trabalho, foi a de explorar a fisiologia das regiões dos braços curtos, das constrições secundárias dos satélites dos cromossomos acrocêntricos. O estudo do fenômeno celular da associação é uma das maneiras de se conhecer o comportamento destes cromossomos e sua função. O efeito de variantes menores nas associações em que participam, em cada indivíduo, revela o comportamento destes acrocêntricos a nível fisiológico. Qualquer efeito fenotípico desta variante sobre os padrões de associação do indivíduo portador poderia ser detectado se comparados indivíduos portadores e não-portadores, *pareados* pelos fatores que interferem nas associações, como idade, sexo, técnicas de cultura das células, etc., ainda que todos os indivíduos tivessem a variante no mesmo par cromossômico.

Uma das publicações que se destaca, nesse sentido, é a de ORYE (1974), que comparou cromossomos do grupo G de indivíduos com e sem variantes. Estes resultados suportam a existência de *mecanismos regulatórios* da expressão heteropictônica. Em cada par de homólogos haveria pequenas diferenças reveladas por Q-

bandeamento, que dentro de certos limites poderiam ser consideradas como a expressão citológica do grau de atividade gênica dos organizadores nucleolares. Cromossomos com modificações na região nucleolar, como o aumento no tamanho dos braços curtos, das constrições ou dos satélites, estariam sempre ativos. A existência destes *mecanismos regulatórios* poderia explicar, inclusive, aquela tendência por nós comentada, de os cromossomos marcadores se associarem com uma frequência maior.

Um outro aspecto relacionado com este resultado diz respeito à localização das RON nos cromossomos acrocêntricos. É fato que o número de genes que são transcritos em ARNr 18S e 28S, em um determinado cromossomo, é variável, e que esta variação está relacionada com as frequências com que cada cromossomo se associa. A relação entre morfologia das RON que reflete a quantidade de ADNr - revelada pela hibridação do ARN marcado ou, ainda, pela impregnação da prata - e a frequência de associação tem sido amplamente estudada (ORYE, 1974; SCHMID & KRONE, 1974; ZANKL & ZANG, 1974 e ARCHIDIACONO et al., 1977). Uma vez que nossos resultados sugerem que cromossomos *s+* associam-se preferencialmente, podemos inferir que a região dos satélites está, de alguma forma, envolvida com a produção de ARNr. De acordo com ARRIGHI & SAUNDERS, 1973 (segundo

SCHWARZACHER, 1976) cerca de 30 a 35% de genoma humano seria composto por ADN repetitivo localizado praticamente em todas as regiões que apresentam heterocromatina constitutiva. Entre as regiões que contêm ADN repetitivo estão os cistrons responsáveis pela organização nucleolar. As curvas obtidas através da microfotodensitometria (Figura d) dos acrocêntricos autossômicos do grupo G de um dos indivíduos da amostra*, portador de satélite gigante em um dos homólogos do par 22, revelam que a região dos satélites do cromossomo marcador se comporta, densitometricamente, de modo semelhante à região centromérica que é heterocromática. O mesmo não é observado nos demais acrocêntricos. MARTIN et al. (1979) demonstrou que o material impregnado pela prata amoniacal correspondia à região das constricções secundárias e à parte distal dos satélites que, em conjunto, representariam as RON. Em Material e Métodos são apresentadas fotos de cromossomos do mesmo indivíduo, tratados pela técnica de G, C e N-bandeamento onde se evidencia a sensibilidade da variante em estudo a estes tratamentos.**

Ainda que se admita, como a maioria dos auto-

* Curvas semelhantes foram obtidas de outros 5 indivíduos da amostra; cada um deles representa uma das famílias estudadas.

**A presença de satélite gigante é evidenciada em outras 5 fotos obtidas de cromossomos tratados com G-bandeamento e que correspondem aos indivíduos que representam cada uma das famílias estudadas.

res, que as RON estejam localizadas nas constrições secundárias dos acrocêntricos, uma série de dados tais como os de MATSUI & SASAKI, 1973 (segundo GOODPASTURE et al., 1976), os de HAYATA et al (1977) e inclusive os que apresentamos, indicaram que as RON estariam na região dos satélites e que o aumento de material nesta região implica em uma capacidade maior de associação dos cromossomos que o possuem. Desta forma, este material adicional estaria comprometido com o conteúdo de ADNr que é, conforme se aceita, um dos fatores que interferem nas frequências de associação. Assim, estas variantes estruturais estariam comprometidas, direta ou indiretamente, com a produção de ARNr.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos apontar as seguintes conclusões:

1. Os padrões de associações simples classificados por grupo (D-D, D-G e G-G) não se mostraram diferentes, isto é, apresentaram um comportamento casual.

2. A frequência dos tipos de associação simples, classificados por par cromossômico, que compõem o grupo₁ (13-13, 13-14, etc.) e o grupo₃ (21-21, 21-22 e 22-22) se mostraram diferentes, sendo que as associações entre cromossomos homólogos foram mais raras que as entre cromossomos heterólogos. Para o grupo₁ (D-D), as associações entre homólogos ocorreram com uma frequência média igual a 0,333 por indivíduo, enquanto as associações entre heterólogos ocorreram com uma frequência média igual a 2,367. Para o grupo₃ (G-G), estes valores foram iguais a 0,900 e 2,400 respectivamente.

3. Os coeficientes de determinação genotípica para o caráter *frequência de associação*, estimados para *grupos* (igual a 9,43%) e para *tipos dentro de grupos* (igual a 20,52%) nos permitem concluir que cerca de 70,05% das variações observadas possuem causas que não se devem ao fato de a associação pertencer a um determinado grupo ou mesmo aos tipos que compõem os grupos.

4. Os vários indivíduos da amostra não diferiram em relação às suas frequências de associação, avaliadas pela participação dos diferentes pares cromossômicos.

O comportamento dos diversos pares de acrocêntricos, nas associações simples e múltiplas, foi casual, sendo a frequência do par 21 ligeiramente maior que as demais.

5. O comportamento associativo dos cromossomos marcadores e de seus homólogos não se mostrou diferente nos vários indivíduos da amostra.

A análise da frequência do cromossomo marcador, comparada à de seu homólogo, revelou que cromossomos com variantes associavam-se preferencialmente ($0,05 < P < 0,1$). Isto sugere a existência de cistrons ribossomais na região dos satélites dos acrocêntricos.

SUMMARY

One of the aspects that has been explored when studying the minor chromosome variants is the association behaviour of the acrocentric marker chromosomes. It has been known for long that acrocentric chromosomes associate themselves for the organization of the nucleolus. The studies about the patterns of acrocentric satellite associations reveal the participation of these chromosomes in the nucleolous formation. The presence of morphologic variants in the acrocentric chromosomes allows the distinction between the homologous and, consequently, the comparative analysis between them.

The purpose of our research is to elaborate an analysis similar to the one mentioned above by using a sample of ten normal people having giant satellites. The chromosomic identification worked out through the G-banding technique allowed the single associations (that added up to 70% of the sample), classified in groups (D-D,1; D-G,2 & G-G,3), to be subdivided into

several types, according to the involved chromosomes (13-13; 13-14, etc.).

The results of the statistic analysis indicated that the frequencies of the three association groups show no difference. On the other hand, this phenomenon did not occur when the association types of groups 1 and 3 were considered, being the associations between homologous chromosomes rarer than the ones between heterologous.

The participation of the different acrocentric pairs, as far as single and multiple associations are concerned, occurred by chance, being the frequency of pair 21 slightly bigger.

The association behaviour of the acrocentric marker chromosomes when compared to their homologous did not present any difference among all the individuals of the sample. The chromosomes D and Gs+ are preferentially involved in satellite association ($0,05 < P < 0,1$). This suggests the existence of ribosomal cistrons in the acrocentric satellite region.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALFI, O.S. & DONNELL, G.N. (1972). Patterns of associations of acrocentric chromosomes studied by quinacrine fluorescence. Am.J.Hum.Genet. 24: 10a.
2. ARCHIDIACONO, N.; CAPOA, A.; FERRARO, M.; PELLICIA, F.; ROCCHI, A. & ROCCHI, M. (1977). Nucleolus organizer and N-band distribution in morphologic and fluorescence variants in human chromosomes. Hum.Genet. 37:285-289.
3. ARDITO, G.; LAMBERTI, L. & BRØGGER, A. (1978). Satellite associations of human acrocentric chromosomes identified by trypsin treatment at metaphase. Ann.Hum.Genet. 41:455-462.
4. ARRIGHI, F.E. & SAUNDERS, G.F. (1973). The relationship between repetitious DNA and constitutive heterochromatin with special reference to man. In: PFEIFFER, R.A. ed. Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive heterochromatin in man. New York (Apud: SCHWARZACHER, H.G., 1976, op. cit.).
5. ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics. 10:81-86.
6. BENNETT, C.A. & FRANKLIN, N.L. (1963). Statistical analyses in chemistry and the chemical industry. New York, John Wiley, 724 p.
7. BIRNSTIEL, M.; SPEIRS, J.; PURDOM, J.; JONES, K. & LOENING, U.E. (1968). Properties and composition of the isolated ribosomal DNA satellite of *Xenopus laevis*. Nature. 219:454-463 (Apud:

SCHWARZACHER, H.G., 1976, op. cit.).

8. BROSS, K. & KRONE, W. (1972). On the number of ribosomal RNA genes in man. Humangenetik. 14:137-141. (Apud: STEFFENSEN, D.M., 1977, op. cit.).
9. CAPOA, A.; ROCCHI, A. & GIGLIANI, F. (1973) Frequency of satellite association in individuals with structure abnormalities of nucleolus organizer region. Humangenetik. 18:111-115.
10. CAPOA, A.; FERRARO, M.; ARCHIDIACONO, N.; PELLICIA, F.; ROCCHI, M. & ROCCHI, A. (1976). Nucleolus organizer and satellite association in a variant D-group chromosome. Hum.Genet. 34:13-16.
11. CAPOA, A.; FERRARO, M.; MENENDEZ, F.; MOSTACCI, C.; PELLICIA, F. & ROCCHI, A. (1978). Ag staining of the nucleolus organizer (NO) and its relationship to satellite association. Hum. Genet. 44:71-77.
12. CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. & MODEST, E.J. (1970). Identification of human chromosomes by D.N.A. - binding fluorescing agents. Chromosoma. 30:215-227.
13. CAVALLI, I.J.; WITTIG, E.O.; MARÇALLO, F.A. & PILOTTO, R.F. (1971). Satélite gigante associado a características clínicas anormais. Ciênc. e Cult. (Supl.). 23:112-113.
14. CHAPELLE, A.; AULA, P. & KIVALO, E. (1963). Enlarged short arm of satellite region - A heritable trait probably unassociated with developmental disorder. Cytogenetics. 2:129-139.
15. CHRISTENSEN, K.R. & NIELSEN, J. (1974). Incidence of chromosome aberrations in a child psychiatric hospital. Clin. Gen. 5:205-210.
16. CHUANG, C.R. & SAUNDERS, G.F. (1974). Complexity of human satellite A DNA. Biochem.Biophys. Res. Commun. 57:1221-1230. (Apud: MACAYA, G.; THIERRY, J.P. & BERNARDI, G., 1977, op. cit.).
17. COHEN, M.M. & SHAW, M.W. (1967). The association of acrocentric chromosomes in 1000 normal human male metaphase cells. Ann.Hum.Genet. 31:129-140.
18. COOKE, P. (1971). Non-random participation of chrô-

- mosomes 13, 14 and 15 in acrocentric associations. Humangenetik. 13:309-314.
19. COOKE, P. (1972). Patterns of secondary association between the acrocentric autosomes of man. Chromosoma. 36:221-240.
 20. COOPER, H.L. & HIRSCHHORN, K. (1961). Les satellites chromosomiques géants: un état familial asymptotique. II. Conference Internationale de Génétique Humaine, Rome. p. 113.
 21. _____. (1962). Enlarged satellites as a familial chromosome marker. Am.J.Hum.Genet. 14:107-124.
 22. CORDEIRO DA SILVA, R.M.P. (1977). Estudo das associações de cromossomos acrocêntricos na espécie humana. Curitiba. 119 p. Tese. Mestrado. UF-PR.
 23. CORNEO, G.; GINELLI, E. & POLLI, E. (1967). A satellite DNA isolated from human tissues. J.Mol.Biol. 23:619-622. (Apud: MACAYA, G.; THIERY, J.P. & BERNARDI, G., 1977, op. cit.).
 24. _____. (1970). Repeated sequences in human DNA. J.Mol.Biol. 48:319-327. (Apud: MACAYA, G.; THIERY, J.P. & BERNARDI, G., 1977, op. cit.).
 25. _____. (1971). Renaturation properties and localization in heterochromatin of human satellite DNA's. Biochim.Biophys.Acta. 247:528-534. (Apud: MACAYA, G.; THIERY, J.P. & BERNARDI, G., 1977, op. cit.).
 26. CORNEO, G.; ZARDI, L. & POLLI, E. (1972). Elution of human satellite DNA's on a methylated albumin Kieselguhr chromatographic column; isolation of satellite DNA IV. Biochim.Biophys.Acta. 269:201-204. (Apud: MACAYA, G.; THIERY, J.P. & BERNARDI, G., 1977, op. cit.).
 27. COURT BROWN, W.M.; JACOBS, P.A.; & BRUNTON, M. (1965). Chromosomes studies on randomly chosen men and women. Lancet. 2:561-562.
 28. CUEVAS-SOSA, A. (1970). Human chromosomology: random association of acrocentrics. Genetica. 41:626-634.
 29. DENTON, T.E.; HOWELL, W.M. & BARRET, J.V. (1976). Human nucleolar organizer chromosomes: satellite-

- te associations. Chromosoma. 55:81-84. (Apud: GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E.; HSU, T.C. & AR-RIGHI, F.E., 1976, op. cit.).
30. DEKABAN, A.S.; BENDER, M.A. & ECONOMOS, G.E. (1963). Chromosome studies in mongoloids and their families. Cytogenetics. 2:61-75.
 31. DRETS, M.E. & SHAW, M.W. (1971). Specific banding patterns of human chromosomes. Proc.Nat. Acad. Sci. 68:2073-2077.
 32. DUTRILLAUX, B. & LEJEUNE, J. (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C.R.Acad.Sci. Ser. D., 278:2638-2640.
 33. ELLIS, J.R.; MARSHALL, R. & PENROSE, L.S. (1962). An aberrant small acrocentric chromosome. Ann. Hum.Genet. 26:77-83.
 34. ELLIS, J.R. & PENROSE, L.S. (1961). Enlarged satellites and multiple malformations in the same pedigree. Ann.Hum.Genet. 25:159-162.
 35. EVANS, H.J.; BUCKLAND, R.A. & PARDUE, M.L. (1974). Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. Chromosoma. 48:405-426.
 36. FERGUSON-SMITH, M.A. & HANDMAKER, S.D. (1961). Observations on the satellited human chromosomes. Lancet. 1:638-640.
 37. _____. (1963). The association of satellited chromosomes with specific chromosomal regions in cultured human somatic cells. Ann.Hum.Genet. 27:143-156.
 38. FERGUSON-SMITH, M.A. (1974). Autosomal polymorphisms. Birth Defects: Orig.Art. Ser. X/10, 19-29.
 39. FITZGERALD, P.H. (1973). The nature and inheritance of an elongated secondary constriction on chromosome 9 of man. Cytogenet.Cell.Genet. 12:404-413.
 40. FONTOURA Jr., E. (1979). Estudos citogenéticos em índios Kaingãg. Curitiba. 133 p. Tese. Mestrado. UFPR.
 41. FRIEDRICH, U. & NIELSEN, J. (1973). Chromosome stu-

- dies in 5049 consecutive newborn children. Clin. Genet. 4:333-343.
42. FUNAKI, K.; MATSUI, S. & SASAKI, M. (1975). Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. Chromosoma. 49:357-370.
 43. FUNDERBURK, S.J.; GUTHRIE, D.; LIND, R.C.; MULLER, H.M.; SPARKES, R.S. & WESTLAKE, J.R. (1978). Minor chromosome variants in child psychiatric patients. Am.J.Med.Genet. 1:301-308.
 44. GIGLIANI, F.; CAPOA, A. & ROCCHI, A. (1972). A marker chromosome number 14 with double satellite observed in two generations: an unbalanced chromosome constitution associated with normal phenotype. Humangenetik. 15:191-195.
 45. GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E.; HSU, T.C. & ARRIGHI, F.E. (1976). Human nucleolus organizers: the satellites or the stalks? Am.J.Hum.Genet. 28:559-566.
 46. GOSDEN, J.R.; MITCHELL, A.R.; BUCKLAND, R.A.; CLAYTON, R.P. & EVANS, H.J. (1975). The location of four human satellite DNAs on human chromosomes. Exp.Cell Res. 92:148-158.
 47. GOSDEN, J.R.; LAWRIE, S. & SEUANEZ, H. (1978). Ribosomal and human homologous repeated DNA distribution in the orangutan (*Pongo pygmaeus*): comparison with the distribution of these DNAs in the other species of the Hominidae. Cytogenet. Cell Genet. 21:1-10.
 48. GOSDEN, J.R.; GOSDEN, C.M.; LAWRIE, S.S. & BUCKTON, K.E. (1979). Satellite DNA loss and nucleolar organiser activity in a individual with a *de novo* chromosome 13, 14 translocation. Clin.Gen. 15:518-529.
 49. GROUCHY, J.; THIEFFRY, S.; ARTHUIS, M.; GERBEAUX, J.; POUPINET, S.; SALMON, Ch. & LAMY, M. (1964). Chromosomes marqueurs familiaux et aneuploidie. Role possible de l'interaction chromosomique. Ann.Génét. 7:76-83.
 50. GUANTI, G. & MARITATO, F. (1978). rDNA and nucleolus organizer regions in man. V. rDNA levels and protein synthesis. Clin.Genet. 14:290-291.

51. HAMERTON, J.L.; GIANNELLI, F. & POLANI, P.E. (1965). Cytogenetics of Down's syndrome (mongolism) I. Data on a consecutive series of patients referred for genetic counselling and diagnosis. Cytogenetics. 4:171-185.
52. HAMERTON, J.L.; CANNING, N.; RAY, M. & SMITH, S. (1975). A cytogenetic survey of 14.069 newborn infants - I. Incidence of chromosome abnormalities. Clin.Gen. 8:223-243.
53. HANDMAKER, S.D. (1963). The satellited chromosomes of a man with reference to the Marfan' syndrome. Am.J.Hum.Genet. 15:11-18.
54. HATLEN, L. & ATTARDI, G. (1971). Proportion of the HeLa cell genome complementary to transfer RNA and 5S RNA. J.Mol.Biol. 56:535-553.
55. HAYATA, I.; OSHIMURA, M. & SANDBERG, A. (1977). N-band polymorphism of human acrocentric chromosomes and its relevance to satellite association. Hum.Genet. 36:55-61.
56. HEITZ, E. (1933). Die somatische Heteropyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung. Z.Zellforsch. 20:237-287. (Apud: OHNO, S.; TRUJILLO, J.M.; KAPLAN, W.D. & KINOSITA, R. 1961, op. cit.).
57. HENDERSON, A.S.; WARBURTON, D. & ATWOOD, K.C. (1972). Location of ribosomal DNA in human chromosome complement. Proc.Nat.Acad.Sci. 69:3394-3398.
58. HENDERSON, A.S. & ATWOOD, K.C. (1976). Satellite-association frequency and rDNA content of a double - satellited chromosome. Hum.Genet. 31:113-115.
59. HERSKOWITZ, I.H. (1977). Principles of Genetics. New York, MacMillan. 836 p.
60. HIRSCHHORN, K.; COOPER, H.L. & MEYER, L.M. (1961). Un cas de mongolisme avec translocation chromosomique, satellites géants familiaux et leucémie. 11^e Conférence Internationale de Génétique Humaine, Rome. p. 109.
61. HOSSFELD, D.K.; IKEUCHI, T. & SANDBERG, A.A. (1970). Chronology and pattern of human chromosome replication. X. Autoradiographic studies of abnormal familial chromosome of the D(13-15)group.

Cytogenetics. 9:351-359.

62. HOWELL, W.M.; DENTON, T.E. & DIAMOND, J.R. (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. Experientia. 31:260-262. (Apud: GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E.; HSU, T.C. & ARRIGHI, F.E., 1976, op. cit.).
63. HUBBELL, H.R. & HSU, T.C. (1977). Identification of nucleolus organizer regions (NORs) in normal and neoplastic human cells by silver-staining technique. Cytogenet.Cell Genet. 19:185-196.
64. JACOBS, P.A.; BRUNTON, M. & COURT BROWN, W.M. (1964). Cytogenetic studies in leucocytes on the general population: subjects of 65 years and more. Ann.Hum.Genet. 27:353-362.
65. JACOBS, P.A.; MAYER, M. & MORTON, N.E. (1976). Acrocentric chromosome associations in man. Am. J. Hum.Genet. 28:567-576.
66. JACOBSON, T.S.; TISCHLER, B. & MILLER, J.R. (1964). Enlarged chromosomal satellites associated with mental retardation and digital arches in three generations. Ann.Hum.Genet. 28:21-26.
67. JONES, K.W.; PROSSER, J.; CORNEO, G. & GINELLI, E. (1973). The chromosomal location of human satellite DNA III. Chromosoma. 42:445-451 (Apud: SCHWARZACHER, H.G., 1976, op. cit.).
68. JONES, K.W.; PURDOM, I.; PROSSER, J. & CORNEO, G. (1975). Localization of human satellite DNA I. Cytogenet.Cell Genet. 14:358. (Apud: STEFFENSEN, D.M., 1977, op. cit.).
69. KÄLLEN, B. & LEVAN, A. (1962). Abnormal length of chromosomes 21 and 22 in four patients with Marfan's syndrome. Cytogenetics. 1:5-19
70. LIEM, S.L.; DENTON, T.E. & CHENG, K.M. (1977). Distribution patterns of satellite associations in human lymphocytes relative to age and sex. Clin. Genet. 12:104-110.
71. LIMA DE FARIA, A.; BIRNSTIEL, M. & JAWORSKA, H. (1969). Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of *Acheta*. Genetics. (Suppl.) 61:145-159. (Apud: SCHWARZACHER, H.G., 1976, op. cit.).

72. LUBS, H.A. & RUDDLE, F.H. (1970). Applications of quantitative karyotyping to chromosome variation in 4400 consecutive newborns. In: JACOBS, P.; PRICE, W.H. & LAW, P. Human Population Cytogenetics. Baltimore, Williams and Wilkins. p. 119-142.
73. LUCIANI, J.M.; STAHL, A. & VAGUE, J. (1968). Huit cas de satellite double, et occasionnellement triple, sur un chromosome du group D, dont six cas familiaux. Ann. Génét. 11:157-158.
74. MACAYA, G.; THIERY, J.P. & BERNARDI, G. (1977). DNA sequences in man. In: YUNIS, J. J. Molecular Structure of Human Chromosomes. New York, Academic Press. p.35-58.
75. MARCOVIĆ, V.D.; WORTON, R.G. & BERG, J.M. (1978). Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. Hum.Genet. 41:181-187.
76. MARTIN, A.O.; MILLER, L.; SIMPSON, J.L.; THOMAS, C.; RZESZOTARSKI, M.S.; ELIAS, S.; SARTO, G. & PATEL, V.A. (1979). Localization of the nucleolar organizer by computer-aided analyses of a variant n° 21 in a human isolate. Hum.Genet. 48: 211-219.
77. MATSUI, S. & SASAKI, M. (1973). Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. Nature. 246:148-150. (Apud: GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E.; HSU, T.C. & ARRIGHI, F.E., 1976, op. cit.).
78. MATTEI, J.F.; AYME, S.; MATTEI, M.G.; GOUVERNET, J. & GIRAUD, F. (1976). Quantitative and qualitative study of acrocentric associations in 109 normal subjects. Hum.Genet. 34:185-194.
79. MATTEVI, M.S. (1974). Efeitos da senescência no cariótipo humano. Porto Alegre. 119 p. Tese. Doutorado. U.F.R.G.S.
80. McKUSICK, V.A. (1960). Chromosomes in Marfan's syndrome. Lancet. 1:1194.
81. MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAH, R. & MILLER, O, J. (1976-a). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. Exp.Cell Res. 101:235-243. (Apud: SCHWARZACHER, H.G.; MIKELSAAR, A.V. & SCHNEDL,

W., 1978, op. cit.).

82. MILLER, D.A.; TANTRAVAH, R.; DEV, V.G. & MILLER, O.J. (1977). Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. Am.J.Hum.Genet. 29:490-502.
83. MILLER, D.A.; BREG, W.R.; WARBURTON, D.; DEV, V.G. & MILLER, O.J. (1978). Regulation of rRNA gene expression in a human familial 14p+ marker chromosome. Hum.Genet. 43:289-297.
84. MILLER, O.J.; COOPER, H.L. & HIRSCHHORN, K. (1961). Recent developments in human cytogenetics. Eugenics Quarterly. 8:23-33.
85. MILLER, O.J.; MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAH, R. & CROCE, C.M. (1976-b). Expression of human and suppression of mouse nucleolus activity in mouse-human somatic cell hybrids. Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 73:4531-4535. (Apud: SCHWARZACHER, H.G.; MIKELSAAR, A.V. & SCHNEDL, W., 1978, op.cit.).
86. MILLER, O.J. (1978). Magnification and regulation of ribosomal genes in normal cells and cancer cells. Clin.Genet. 14:305-306.
87. MIKELSAAR, A.V.; SCHMID, M.; KRONE, W.; SCHWARZACHER, H.G. & SCHNEDL, W. (1977-a). Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. Hum.Genet. 37:73-77.
88. MIKELSAAR, A.V.; SCHWARZACHER, H.G.; SCHNEDL, W. & WAGENBICHLER, P. (1977-b). Inheritance of Ag-stainability of nucleolus organizer regions-Investigations in 7 families with trisomy 21. Hum.Genet. 38:183-188.
89. MIKELSAAR, A.V. & SCHWARZACHER, H.G. (1978). Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblasts. Hum.Genet. 42:291-299.
90. MOREIRA, L.M.A. (1976). Estudo familiar de alterações cromossômicas estruturais. Ribeirão Preto. 147 p. Tese. Mestrado. USP.
91. MÜLLER, H.J.; KLINGER, H.P. & GLASSER, M. (1975). Chromosome polymorphism in a human newborn population - II. Potentials of polymorphic chro-

- mosome variants for characterizing the idiogram of an individual. Cytogenet.Cell Genet. 15:239-255.
92. MUTCHINICK, O.M. (1976). Estudo comparativo das associações de cromossomos acrocêntricos do grupo G em indivíduos de alto e baixo risco para não-disjunção. Porto Alegre. 141 p. Tese. Doutorado. U.F.R.G.S.
 93. NAKAGOME, Y. (1969). DNA replication studies of human D-group chromosomes in satellite associations. Cytogenetics. 8:296-303.
 94. _____. (1973). G-group chromosomes in satellite associations. Cytogenet.Cell Genet. 12:336-341.
 95. OHNO, S.; TRUJILLO, J.M.; KAPLAN, W.D. & KINOSHITA, R. (1961). Nucleolus-organisers in the causation of chromosomal anomalies in man. Lancet. 2:123-125.
 96. ORYE, E. (1974). Relative activation and inactivation phenomena between homologous and nonhomologous nucleolus organizers on the normal human G chromosomes. Cytogenet.Cell Genet. 13:352-368.
 97. PATIL, S.R. & LUBS, H.A. (1971). Non-random association of human acrocentric chromosomes. Humangenetik. 13:157-159.
 98. PATIL, S.R.; MERRICK, S. & LUBS, H.A. (1971). Identification of each human chromosome with a modified giemsa stain. Science. 173:821-822.
 99. PENROSE, L.S. & DELHANTY, J.D.A. (1961). Familial Langdon Down anomaly with chromosomal fusion. Ann.Hum.Genet. 25:243-252.
 100. PHILLIPS, R.B. (1975). Inheritance of acrocentric association patterns. Humangenetik. 29:309-318.
 101. PIMENTEL GOMES, F. (1970). Curso de estatística experimental. São Paulo. Nobel. 430 p.
 102. RAY, M. & PEARSON, J. (1979). Nucleolar organizing regions of human chromosomes. Hum.Genet. 48:201-210.
 103. SANDS, V.E. (1969). Short arm enlargement in acrocentric chromosomes. Am.J.Hum.Genet. 21:293-304.

104. SAUNDERS, G.F.; SHIRAKAWA, S.; SAUNDERS, P.P.; ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. (1972). Populations of repeated DNA sequences in the human genome. J. Mol. Biol. 63:323-334. (Apud: MACAYA, G.; THIÉRY, J.P. & BERNARDI, G., 1977, op. cit.).
105. SAUNDERS, G.F.; CHUANG, C.R. & SAWADA, H. (1975). Genome complexity and *in vivo* transcription in human leukemic leucocytes. Acta Haematol. 54: 227-233. (Apud: MACAYA, G.; THIÉRY, J.P. & BERNARDI, G., 1977, op. cit.).
106. SBALQUEIRO, I.J. (1977). Comunicação Pessoal.
107. SCHMICKEL, R.D. (1973). Quantitation of human ribosomal DNA: hybridization of human DNA with ribosomal RNA quantitation and fractionation. Pediat. Res. 7:5-12.
108. SCHMID, M. & KRONE, W. (1974). On the relationship between the frequency of association and the nucleolar constriction of individual acrocentric chromosomes. Humangenetik. 23:267-277.
109. SCHWARZACHER, H.G. (1976). Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. 1/3. Chromosomen. Berlin. Springer-Verlag. 182 p.
110. SCHWARZACHER, H.G.; MIKELSAAR, A.V. & SCHNEDL, W. (1978). The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Cytogenet. Cell Genet. 20:24-39.
111. SEABRIGHT, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosome. Lancet. 2:971-972.
112. SHAW, M.W.; CRAIG, A.P. & RICCIUTI, F.C. (1969). Random association of human acrocentric chromosomes. Am. J. Hum. Genet. 17:191-201.
113. SIRLIN, J.L. (1961). The nucleolus of the cell nucleus. Endeavour. 20:146-153. (Apud: MUTCHINICK, O.M., 1976, op. cit.).
114. SPADARI, S.; DI LERNIA, R.; SIMONI, G.; PEDRALINOY, G. & DE CARLI, L. (1973). Localization of ribosomal RNA genes on human acrocentric chromosomes. Mol. Gen. Genet. 127:57-67.
115. STAHL, A.; HARTUNG, M. & VAGNER-CAPODANO, A.M. &

- FOUET, C. (1976). Chromosomal constitution of nucleolus-associated chromatin in man. Hum. Genet. 35:27-34.
116. STARKMAN, M.N. & SHAW, M.W. (1967). Atypical acrocentric chromosomes in negro and caucasian mongols. Am.J.Hum.Genet. 19:162-173.
117. STEFFENSEN, D.M.; PRENSKY, W.; MUTTON, D. & HAMERTON, J.L. (1975). Mapping the human 5S RNA genes on chromosome 1 using translocations. Cytogenet.Cell Genet. 14:434-438.
118. STEFFENSEN, D.M. (1977). Human gene localization by RNA:DNA hybridization *in situ*. In: YUNIS, J. J. Molecular Structure of Human Chromosomes. New York, Academic Press. p. 59-88.
119. SUMNER, A.T.; EVANS, H.J. & BUCKLAND, R.A. (1971). A new technique for distinguishing between human chromosomes. Nature New Biol. 232:31-32.
120. SUMNER, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75:304-306.
121. THARAPPEL, A.T. & SUMMITT, R.L. (1978). Minor chromosome variations and selected heteromorphisms in 200 unclassifiable mentally retarded patients and 200 normal controls. Hum.Genet. 41:121-130.
122. TJIO, J.H.; PUCK, T.T. & ROBINSON, A. (1960). The human chromosomal satellites in normal persons and in two patients with Marfan's syndrome. Proc. Nat.Acad.Sci. 46:532-539.
123. TUNCBILEK, E.; BOBROW, M.; CLARKE, G. & TAYSE, K. (1976). A giant short arm of n° 21 chromosome in mother of 21/21 translocation mongol. J.Med. Genet. 13:411-412.
124. WARBURTON, D.; ATWOOD, K.C. & HENDERSON, A.S. (1976). Variation in the number of genes for rRNA among acrocentric chromosomes: correlation with frequency of satellite association. Cytogenet.Cell Genet. 17:221-230.
125. WILSON, M.; FUJIMOTO, A.; SHINNO, N.W. & TOWNER, J.W. (1973). Giants satellites or translocation? Cytogenet. Cell Genet. 12:209-214.

126. ZANG, K.D. & BACK, E. (1968). Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes - I. Individual features in the associations pattern of the acrocentric chromosomes of normal males and females. Cytogenetics. 7:455-470.
127. ZANKL, H. & ZANG, K.D. (1971). Structural variability of the normal human karyotype. Humangenetik. 13:160-162.
128. _____. (1974). Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes - IV. The association frequency of human acrocentric marker chromosomes. Humangenetik. 23:259-265.